

**Untersuchungen zum Sox-Multienzymkomplex in *Allochromatium
vinosum* und zur Verwertung von Elementarschwefel in
phototrophen Schwefeloxidierern**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Bettina Franz

aus

Landsberg am Lech

Bonn 2010

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

1. Referent: apl. Prof. Dr. Christiane Dahl

2. Referent: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier

Tag der Promotion: 28.05.2010

Erscheinungsjahr der Dissertation: 2010

Materie ist die Hartnäckigkeit der kleinsten Lebewesen.

Wilhelm Busch



Inhalt

A Einleitung	1
1 Der biologische Schwefelkreislauf	1
2 <i>Allochromatium vinosum</i>	3
2.1 Oxidation von Sulfid und Polysulfiden	4
2.2 Oxidation von Thiosulfat	5
2.3 Verwertung von Elementarschwefel	8
2.4 Schwefelkugeln und deren Oxidation zu Sulfit	10
2.5 Oxidation von Sulfit	11
3 Weitere Vertreter der <i>Chromatiaceae</i> und <i>Ectothiorhodospiraceae</i>	12
3.1 <i>Thiocapsa roseopersicina</i>	13
3.2 <i>Halorhodospira halophila</i>	13
3.3 <i>Halorhodospira abdelmalekii</i>	14
4 Zielsetzung der Arbeit	14
B Material & Methoden	17
1 Chemikalien, Enzyme, Kits, sonstige Materialien und Software	17
1.1 Chemikalien	17
1.2 Enzyme	17
1.3 Kits	18
1.4 Sonstige Materialien	18
1.5 Computersoftware und Onlinetools	19
2 Organismen, Oligonukleotide und Plasmide	19
2.1 Organismen	19
2.2 Oligonukleotide	20
2.3 Plasmide	21
3 Mikrobiologische Methoden	21
3.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	21
3.2 Kultivierung von <i>Allochromatium vinosum</i>	22
3.2.1 Nährmedien für die Anzucht und Aufbewahrung von <i>A. vinosum</i>	22
3.2.2 Kulturverfahren für <i>Alc. vinosum</i>	24
3.2.3 Aufbewahrung von <i>Alc. vinosum</i>	25
3.3 Kultivierung von <i>Tca. roseopersicina</i>	25
3.3.1 Nährmedium für die Anzucht von <i>Tca. roseopersicina</i>	25
3.3.2 Kulturverfahren für <i>Tca. roseopersicina</i>	25
3.4 Kultivierung von <i>Hlr. halophila</i>	25
3.4.1 Nährmedium für die Anzucht von <i>Hlr. halophila</i>	25
3.4.2 Kulturverfahren für <i>Hlr. halophila</i>	26
3.5 Kultivierung von <i>Hlr. abdelmalekii</i>	26
3.5.1 Nährmedium für die Anzucht von <i>Hlr. abdelmalekii</i>	26
3.5.2 Kulturverfahren für <i>Hlr. abdelmalekii</i>	27
3.6 Kulturverfahren zur Bestimmung des Umsatzes reduzierter Schwefelverbindungen	27
3.6.1 Kultivierung im Fermenter	27
3.6.2 Kultivierung in Flaschen	29
3.7 Mikroskopische Methoden	29
3.7.1 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	29
3.7.2 Rasterelektronenmikroskopie	30
4 Chemisch-analytische Methoden	30

4.1 Analytische Bestimmung von Schwefelverbindungen	30
4.1.1 HPLC-Analyse von Monobromobimanderivaten	30
4.1.2 HPLC-Analyse von Sulfat	31
4.1.3 Nasschemische Sulfatbestimmung	32
4.1.4 Nasschemische Sulfitbestimmung	32
4.1.5 Bestimmung des intrazellulären Schwefels	33
4.1.6 Bestimmung der Proteinkonzentration in <i>Alc. vinosum</i> -Kulturen	33
4.1.7 Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen	34
4.1.8 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen	34
4.1.9 Zuckerbestimmung	35
5 Molekularbiologische Methoden	35
5.1 Amplifikation von DNA und RNA	35
5.1.1 Standardprotokoll für die PCR	35
5.1.2 Protokoll für die Kolonie-PCR	36
5.1.3 <i>in vitro</i> -Transkription von DNA	36
5.1.4 Quantitative real-time RT-PCR	37
5.2 DNA-Transfer	38
5.2.1 Transformation kompetenter Zellen	38
5.2.2 DNA-Transfer von <i>E.coli</i> nach <i>Alc. vinosum</i>	38
5.2.3 Selektion positiver Klone	39
5.3 Enzymatische Modifikation von DNA	39
5.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	39
5.3.2 Manipulation von DNA-Einzelstrangenden	39
5.3.3 Dephosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase	40
5.3.4 Ligation von DNA	40
5.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA	40
5.4.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA	40
5.4.2 Agarose-Gelelektrophorese von RNA	41
5.5 Reinigung von DNA und RNA	42
5.5.1 Reinigung von DNA	42
5.5.2 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	42
5.5.3 Reinigung von RNA	42
5.6 Methoden zur Präparation von DNA und RNA	42
5.6.1 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Alc. vinosum</i>	42
5.6.2 Isolierung von RNA aus <i>Alc. vinosum</i>	44
5.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	44
6 Biochemische Methoden	45
6.1 Reinigung und Isolierung von Proteinen	45
6.1.1 Präparation von periplasmatischen Proteinen aus <i>Alc. vinosum</i>	45
6.1.2 Präparation von cytoplasmatischen Proteinen aus <i>Alc. vinosum</i>	45
6.1.3 Reinigung von Proteinen mit Strep-Tag aus <i>Alc. vinosum</i>	46
6.1.4 Isolierung von Proteinen der äußeren Membran nach Hindennach & Henning, 1975	46
6.1.5 Isolierung von Proteinen der äußeren Membran nach Shen <i>et al.</i> , 1989	46
6.2 Elektrophoretische Proteintrennung	47
6.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
6.2.3 Coomassie-Färbung	48
6.2.4 Silberfärbung	48
6.3 Bestimmung der spezifischen β -Galactosidase-Aktivität	48
7 Physikalische Methoden	50
7.1 XANES-Spektroskopie an der Schwefel-K-Kante	50

7.1.1 Experimenteller Aufbau	50
7.1.2 Quantitative Analyse von XANES-Spektren	51
7.1.3 Probenpräparation	51
8 Sonstige Methoden	52
8.1 Layer-by- Layer Nanoeinkapselung	52
8.1.1 Einkapselung von Bakterien	52
8.1.2 Bestimmung des ζ -Potentials	52
8.1.3 Polyelektrolyte für die Einkapselung von Bakterien	53
8.2 Extraktion von extrazellulären, polymeren Substanzen	53
8.2.1 Chemische Methoden	53
8.2.2 Physikalische Methoden	54
8.2.3 Kombination aus chemischer und physikalischer Methode	54
C Ergebnisse	55
1 Untersuchungen zum Sox-Multienzymkomplex in <i>Alc. vinosum</i>	55
1.1 Sulfitoxidation in <i>Alc. vinosum</i>	55
1.1.1 Erzeugung der Mutanten <i>Alc. vinosum aprAB::Ω-Km</i> und <i>ΔsoxY-aprAB::Ω-Km</i>	55
1.1.2 Sulfitoxidation in <i>Alc. vinosum sox-</i> und <i>aprAB</i> -Mutanten	55
1.1.3 Untersuchung der Schwefelkugeln der Mutante <i>Alc. vinosum ΔsoxY</i>	57
1.1.4 Suche nach einem weiteren sulfitoxidierenden Enzym	60
1.2 Regulation der Transkription und Translation der <i>sox</i> -Gene in <i>Alc. vinosum</i>	61
1.2.1 Anordnung der <i>sox</i> -Gene im Genom von <i>Alc. vinosum</i>	61
1.2.2 Transkription der <i>sox</i> -Gene	65
1.2.2.1 Herstellung von RNA-Standards für die real-time RT-PCR	65
1.2.2.2 Transkription der Gene <i>soxB</i> , <i>soxX</i> und <i>soxY</i>	66
1.2.2.2.1 Transkription in Anwesenheit verschiedener Elektronendonoren	66
1.2.2.2.2 Transkription bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sulfid und Thiosulfat	68
1.2.2.2.3 Transkription in den Mutanten <i>Alc. vinosum soxB::Ω-Km</i> , <i>soxX::Ω-Km</i> und <i>ΔsoxY</i>	69
1.2.3 Translation der <i>sox</i> -Gene	75
1.2.3.1 Erzeugung der Mutanten <i>Alc. vinosum Tl-soxB</i> , <i>Tl-soxX</i> und <i>Tl-soxY</i>	75
1.2.3.2 Herstellung der Vektoren pK235 und pK236	75
1.2.3.3 Herstellung und Überprüfung der Mutanten	76
1.2.3.4 Translation in Anwesenheit verschiedener Elektronendonoren	77
1.2.3.5 Translation bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sulfid und Thiosulfat	79
1.2.3.6 Abhängigkeit der Translation der <i>sox</i> -Gene von der Thiosulfatkonzentration	80
1.2.4 Sequenzvergleich von AlvinDRAFT_0674	81
1.2.5 Sequenzvergleich von AlvinDRAFT_0675	82
2 Untersuchungen zur Verwertung von Elementarschwefel durch <i>Alc. vinosum</i> und andere Schwefelpurpurbakterien	84
2.1 Einfluss der Schwefelspeziation auf die Verwertung von Elementarschwefel	84
2.1.1 Speziationsbestimmung von Elementarschwefel	84
2.1.2 Einfluss der Schwefelspeziation auf die Elementarschwefelverwertung durch <i>Chromatiaceae</i>	85
2.1.2.1 <i>Allochromatium vinosum</i>	85
2.1.2.2 <i>Thiocapsa roseopersicina</i>	89
2.1.3 Einfluss der Schwefelspeziation auf die Elementarschwefelverwertung durch <i>Ectothiorhodospiraceae</i>	91
2.1.3.1 <i>Halorhodospira halophila</i>	91
2.1.3.2 <i>Halorhodospira abdelmalekii</i>	92
2.2 Nachweis löslicher Intermediate bei der Schwefelaufnahme in <i>Alc. vinosum</i>	93
2.2.1 Nachweis mittels HPLC detektierbarer Schwefelverbindungen durch XANES-	

Spektroskopie	93
2.2.2 Nachweis weiterer Schwefelspezies	98
2.2.3 Untersuchung der Überstände von <i>Alc. vinosum</i> -Kulturen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen	99
2.3 Untersuchungen zum Zell-Schwefelkontakt	106
2.3.1 Direkter Zell-Schwefelkontakt bei <i>Alc. vinosum</i> , <i>Tca. roseopersicina</i> und <i>Hlr. halophila</i>	106
2.3.2 Isolierung der Proteine der äußeren Membran von <i>Alc. vinosum</i>	107
2.3.2.1 Isolierung nach Hindennach & Henning (1975)	107
2.3.2.2 Isolierung nach Shen <i>et al.</i> (1989)	109
2.3.3 Zell-Schwefelkontakt über extrazelluläre, polymere Substanzen	109
2.3.4 Untersuchungen zur Rolle der Oberflächenladung der Zelle	110
2.3.4.1 ζ -Potential von <i>Alc. vinosum</i> unter verschiedenen Wachstumsbedingungen	111
2.3.4.2 Elektrochemische Veränderungen der Zelloberfläche	112
2.3.4.3 Bildung einer physikalischen Barriere	118
2.4 Einfluss von Inhibitoren auf die Schwefelaufnahme in <i>Alc. vinosum</i>	122
2.4.1 Zugabe von CCCP	122
2.4.2 Zugabe von Natriumarsenat	126
2.4.3 Zugabe von Iodacetamid	130
D Diskussion	135
1 Untersuchungen zum Sox-Multienzymkomplex in <i>Alc. vinosum</i>	135
1.1 Sulfitoxidation in <i>Alc. vinosum</i>	135
1.2 Regulation der Transkription und Translation der <i>sox</i> -Gene in <i>Alc. vinosum</i>	140
2 Untersuchungen zur Verwertung von Elementarschwefel durch <i>Alc. vinosum</i> und andere Schwefelpurpurbakterien	153
2.1 Einfluss der Schwefelspeziation auf die Verwertung von Elementarschwefel	153
2.2 Mobilisierung von Elementarschwefel	156
2.3 Einfluss von Inhibitoren auf die Schwefelaufnahme in <i>Alc. vinosum</i>	163
2.4 Potentiell für die Schwefelaufnahme relevante Gene in <i>Alc. vinosum</i>	164
E Zusammenfassung	165
Literaturverzeichnis	169
Anhang	185
Danksagung	195
Veröffentlichungen	197
Lebenslauf	199

Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
(k)Da	(Kilo-)Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	d-Nucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>g</i>	Gravitationskonstante
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]-piperazin-N`-[2-ethan-sulfonsäure]
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
M	molar
kb	Kilobasenpaare
Km	Kanamycin
LbL	Layer-by-Layer
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PAA	Poly(acrylsäure)
PAH	Poly-(allylamin)hydrochlorid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDDA	Poly(diallyldimethylammoniumchlorid)
PGA	Poly(glutaminsäure)
PSS	Natriumpoly(styrensulfonat)
Rif	Rifampicin
RNase	Ribonuclease
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylendiamin
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
XANES	X-ray absorption near edge structure

Einleitung

1 Der biologische Schwefelkreislauf

Im biologischen Kreislauf des Schwefels spielen Mikroorganismen eine dominierende Rolle (Dahl *et al.*, 2002). Dementsprechend hat die Entdeckung und Erforschung von Schwefelbakterien eine sehr lange Geschichte. Bereits 1786 wurde von Müller eine „farblose, eiförmige Alge mit kugelförmigen Einschlüssen“ beschrieben, die 1875 von Warming als Schwefelbakterium (*Thiovulum muelleri*) mit Schwefeleinschlüssen erkannt wurde. Während des 19. Jahrhunderts wurden weitere Schwefelbakterien entdeckt (z.B. Ehrenberg, 1838; Perty, 1852; Beggiato, 1838; Trevisan, 1842; Cohn, 1865, zitiert nach Dahl *et al.*, 2002) und man begann mit der Erforschung der Schwefelkugeln im Inneren dieser Organismen (Cramer, 1870; Cohn, 1865, zitiert nach Dahl *et al.*, 2002). 1895 wurde dann das erste sulfatreduzierende Bakterium (*Spirillum desulfuricans*) gefunden und der Unterschied zwischen dissimilatorischer und assimilatorischer Sulfatreduktion erkannt (Beijerinck, 1895, zitiert nach Dahl *et al.*, 2002). Das Interesse an der Erforschung der Schwefelbakterien hielt während des 20. Jahrhunderts an und führte neben der Entdeckung weiterer Arten zu ersten Studien zur Oxidation von Schwefel in der bakteriellen Photosynthese (Bavendamm, 1924; Bunker, 1936; Van Niel, 1931; Van Niel, 1936, zitiert nach Dahl *et al.*, 2002). Bis heute wurden beständig weitere Erkenntnisse zu den am Schwefelkreislauf beteiligten Organismen gesammelt, so dass sich ein immer klareres Bild ergibt - auch wenn noch immer viele Fragen offen bleiben.

Während schwefelhaltige organische Verbindungen wie Aminosäuren, (Poly-)peptide, enzymatische Cofaktoren, Antibiotika und Saccharide in lebenden Organismen vielfältige katalytische, strukturelle und regulatorische Funktionen erfüllen, ist die biologische Rolle anorganischer Schwefelverbindungen eng umgrenzt (Brüser *et al.*, 2000). Sie dienen entweder als Quelle für die Assimilation und den Einbau von Schwefel in die genannten organischen Verbindungen oder als Elektronendonoren oder -akzeptoren im dissimilatorischen Elektronentransport, wobei über diesen ein elektrochemisches Membranpotential aufgebaut wird, welches wiederum für die ATP-Synthese, die Reduktion von NAD oder andere energieabhängige Prozesse benötigt wird. Aus der biochemischen Oxidation und Reduktion

von Schwefelverbindungen setzt sich der biologische Schwefelkreislauf zusammen (Abbildung 1). Während die assimilatorische Reduktion von Sulfat sowohl in Prokaryoten als auch in Pilzen, Pflanzen und Tieren weit verbreitet ist, beschränken sich die dissimilatorischen Stoffwechselwege im Wesentlichen auf Eubakterien und Archaeobakterien.

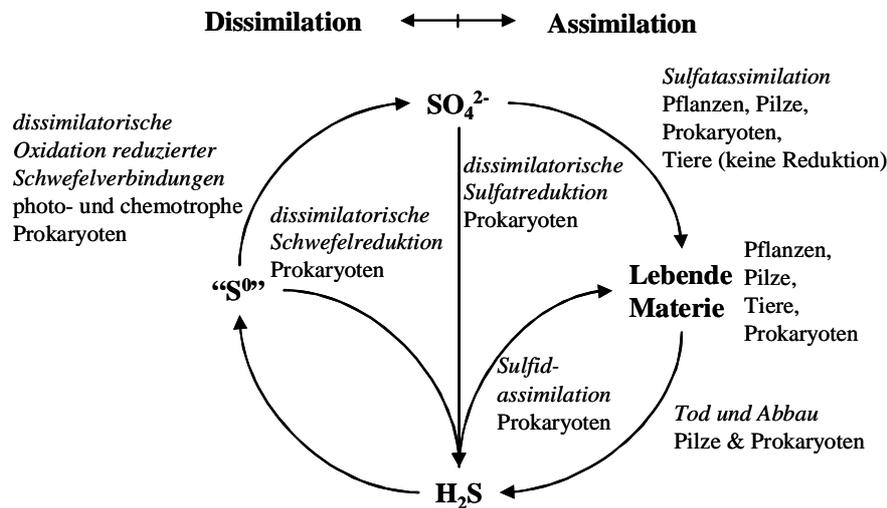


Abbildung 1. Vereinfachter Überblick über den biologischen Schwefelkreislauf in der Natur (nach Dahl *et al.*, 2002)

Man kann hier dissimilatorische Oxidations- und Reduktionsreaktionen unterscheiden (Dahl *et al.*, 2002). Bei der dissimilatorischen Oxidation dienen anorganische Schwefelverbindungen wie Sulfid, Polysulfide, Elementarschwefel, Sulfit, Thiosulfat und verschiedene Polythionate als Elektronendonoren für die Energieumwandlung in Bakterien. Im umgekehrten Prozess, der dissimilatorischen Reduktion nutzen Prokaryoten organische und anorganische Schwefelverbindungen wie Sulfat, Sulfit, Thiosulfat, organische Sulfoxide, Elementarschwefel, anorganische Polysulfide und organische Disulfane als terminale Elektronenakzeptoren der anaeroben Atmung.

Die dissimilatorische Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen beschränkt sich auf chemo- und phototrophe Bakterien (Dahl *et al.*, 2002; Brüser *et al.*, 2000). Chemotrophe Organismen oxidieren reduzierte Schwefelverbindungen unter alkalischen, neutralen oder sauren Bedingungen, wobei entweder Sauerstoff oder Nitrat als Elektronenakzeptor genutzt wird. In vielen anoxygenen, phototrophen Bakterien werden reduzierte Schwefelverbindungen unter anoxischen Bedingungen als photosynthetische Elektronendonoren genutzt. Neben einigen Vertretern anderer Gruppen anoxygener, phototropher Bakterien sind hier vor allem Angehörige der Schwefelpurpurbakterien und der grünen Schwefelbakterien zu nennen (Frigaard & Dahl, 2009). Beide Gruppen speichern die

erfolgt über den reduktiven Pentosephosphatweg (Brune, 1989). Der Organismus wächst photolithoautotroph mit Sulfid, Polysulfiden, Thiosulfat, Sulfit, Elementarschwefel und molekularem Wasserstoff als Elektronendonoren (Imhoff, 2005a; Steudel *et al.*, 1990). Für photoheterotrophes Wachstum können auch Formiat, Acetat, Propionat, Pyruvat, Fumarat, Malat und Succinat genutzt werden (Imhoff, 2005a). Dienen reduzierte Schwefelverbindungen als Elektronendonoren, wird der Schwefel in Form von intrazellulären Schwefelkugeln gespeichert und anschließend vollständig zu Sulfat oxidiert. *Alc. vinosum* ist in Bezug auf seinen Schwefelstoffwechsel der am besten erforschte Organismus unter den anoxygenen, phototrophen Schwefeloxidierern, da er genetisch manipulierbar ist (Pattaragulwanit & Dahl, 1995). Abbildung 2 zeigt einen Überblick über die aktuellen Erkenntnisse zum Schwefelstoffwechsel in phototrophen Schwefeloxidierern (Schwefelpurpurbakterien und grüne Schwefelbakterien) (Frigaard & Dahl, 2009). Auf einige der gezeigten Reaktionen wird im Folgenden am Beispiel von *Alc. vinosum* näher eingegangen.

2.1 Oxidation von Sulfid und Polysulfiden

Durch welches Enzym bzw. welche Enzyme Sulfid in *Alc. vinosum* oxidiert wird, ist noch immer nicht eindeutig geklärt. Es gibt drei verschiedene Kandidaten, die derzeit diskutiert werden: eine Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase (SQR), eine Flavocytochrom *c* Sulfiddehydrogenase und das Sox-Multienzymsystem (Frigaard & Dahl, 2009; Abbildung 2). SQR ist in *Rhodobacter capsulatus* essentiell für die Oxidation von Sulfid (Schütz *et al.*, 1999). Es handelt sich um ein membrangebundenes Flavoprotein, dessen aktives Zentrum im Periplasma liegt und das die Elektronen des Sulfid direkt in den Chinonpool überträgt. In der vorläufigen Genomsequenz von *Alc. vinosum* DSM180^T (unter: <http://genome.jgi-psf.org/allvi/allvi.download.ftp.html>) finden sich mit AlvinDRAFT_0695 und AlvinDRAFT_1514 zwei Gene, deren Produkte Ähnlichkeit ($E = 4e^{-43}$ bzw. $2e^{-18}$) zur SQR aus *Rba. capsulatus* aufweisen. Zudem konnte für *Alc. vinosum* biochemisch eine membrangebundene SQR-Aktivität nachgewiesen werden, die sich sensitiv gegenüber verschiedenen Inhibitoren des *bc*₁-Komplexes zeigte (Reinartz *et al.*, 1998). Für AlvinDRAFT_0695 und AlvinDRAFT_1514 werden keine Signalpeptide vorhergesagt, womit die Situation vergleichbar zur SQR aus *Rba. capsulatus* sein könnte, die ebenfalls kein Signalpeptid aufweist, aber durch einen bisher unbekanntem Mechanismus ins Periplasma transportiert wird (Schütz *et al.*, 1999). Als primäres Reaktionsprodukt der SQR-katalysierten

Reaktion aus *Rba. capsulatus* wurden *in vitro* Polysulfide nachgewiesen (Griesbeck *et al.*, 2002). Diese könnten entweder spontan zu Elementarschwefel, der in *Alc. vinosum* in Form von Schwefelkugeln gespeichert wird, reagieren (Steudel, 1996) oder enzymatisch zu diesen umgesetzt werden (Frigaard & Dahl, 2009).

Eine Alternative zur SQR stellt das Flavocytochrom *c* dar. Es handelt sich um ein Protein mit einer 21 kDa-dihäm-Cytochrom-Untereinheit (FccA) und einer 46 kDa Flavoproteinuntereinheit, das *in vitro* die Umwandlung von Sulfid in Elementarschwefel oder Polysulfide mit verschiedenen kleinen, löslichen *c*-Typ-Cytochromen als Elektronenakzeptoren katalysiert (Reinartz *et al.*, 1998). Allerdings ist Flavocytochrom *c* in *Alc. vinosum* nicht essentiell für die Sulfidoxidation (Reinartz *et al.*, 1998). Mutanten, in denen die Gene *fccAB* durch Einfügen einer Kanamycinkassette inaktiviert wurden, zeigten Sulfidoxidationsraten, die denen des Wildtyps vergleichbar waren. Sollte Flavocytochrom *c* in *Alc. vinosum* also an der Sulfidoxidation beteiligt sein, so existiert mindestens ein weiteres Enzym oder ein Enzymkomplex zur Oxidation dieses Substrates in diesem Organismus.

Eine weitere mögliche Alternative wäre die Oxidation von Sulfid durch den Sox-Multienzymkomplex. In *Rhodovulum sulfidophilum*, einem schwefelfreien Purpurbakterium, ist der Sox-Multienzymkomplex *in vivo* nicht nur für die Oxidation von Thiosulfat essentiell, sondern ebenfalls für die von Sulfid (Appia-Ayme *et al.*, 2001). In *Alc. vinosum* ist allerdings auch der Sox-Multienzymkomplex nicht essentiell für die Oxidation von Sulfid. Mutanten, in denen die Gene *soxY*, *soxB* oder *soxX* entweder durch Deletion oder Insertion einer Kanamycinkassette inaktiviert wurden, zeigten Sulfidoxidationsraten, die denen des Wildtyps vergleichbar waren (Hensen, 2006) und auch eine zusätzliche Inaktivierung von *fccAB* wirkte sich nicht auf die Oxidationsraten aus (Franz, 2005). Daher deutet alles darauf hin, dass SQR das dominierende Enzym bei der Oxidation von Sulfid darstellt.

Neben Sulfid können auch Polysulfide von *Alc. vinosum* als Substrat genutzt werden (Steudel *et al.*, 1990). Allerdings ist bisher völlig unbekannt, wie Polysulfide zu intrazellulären Schwefelkugeln umgesetzt werden.

2.2 Oxidation von Thiosulfat

Im Gegensatz zur Oxidation von Sulfid und Polysulfiden ist die Thiosulfatoxidation in *Alc. vinosum* besser verstanden. Der Organismus kann Thiosulfat über zwei verschiedene Wege verstoffwechseln: Im ersten wird Thiosulfat durch den Sox-Multienzymkomplex vollständig zu Sulfat oxidiert (Abbildung 2), im zweiten wird aus zwei

Thiosulfatanionen durch eine Thiosulfatdehydrogenase Tetrathionat gebildet (Frigaard & Dahl, 2009).

Der periplamatische Sox-Multienzymkomplex, der die Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat oxidiert, wurde als erstes für die Chemotrophen *Paracoccus versutus* (Lu *et al.*, 1985) und *Paracoccus pantotrophus* (Friedrich *et al.*, 2001; Rother *et al.*, 2001) beschrieben. In *Pcs. pantotrophus* ist der Sox-Komplex *in vivo* essentiell für die Oxidation von Thiosulfat und katalysiert *in vitro* die Reduktion von Cytochrom *c* verbunden mit der Oxidation von Thiosulfat, Sulfid, Sulfit und Elementarschwefel. Der vorgeschlagene Mechanismus für die Oxidation von Thiosulfat benötigt vier verschiedene Proteine: SoxB, SoxXA, SoxYZ und SoxCD (Friedrich *et al.*, 2001; Abbildung 3a). Das Heterodimer SoxYZ wurde als das substratbindende Molekül des Komplexes identifiziert (Quentmeier & Friedrich, 2001). SoxXA, ein heterodimeres, hämhaltiges Protein, bindet Thiosulfat oxidativ an SoxYZ, wobei SoxXA reduziert wird. Das monomere, manganhaltige SoxB ist für die hydrolytische Abspaltung einer Sulfatgruppe von dem an SoxYZ gebundenen Thiosulfat verantwortlich. SoxCD oxidiert anschließend den verbleibenden Sulfanschwefel, wobei es als Schwefeldehydrogenase fungiert. SoxB spaltet dann ein weiteres Sulfat ab, womit SoxYZ regeneriert wird, so dass es für die weitere Oxidation eines Thiosulfatmoleküls wieder zur Verfügung steht.

In *Alc. vinosum* konnten nur drei der vier in *Pcs. pantotrophus* gefundenen Proteine identifiziert werden: SoxB, SoxXA und SoxYZ (Hensen *et al.*, 2006). Mit Ausnahme von SoxZ wurde für alle Proteine ein Signalpeptid vorhergesagt. Für SoxXA wurde ein Sec-abhängiger Transport ins Periplasma postuliert. Das Protein wurde als Heterodimer gereinigt (SoxX 11 kDa, SoxA 29 kDa), in dem in beiden Untereinheiten kovalent gebundenes Häm nachgewiesen werden konnte. SoxA von *Alc. vinosum* bindet vermutlich wie das Protein aus *Starkeya novella* ein Häm (Kappler *et al.*, 2004), während SoxA aus *Pcs. pantotrophus* und *Rdv. sulfidophilum* zwei Hämgruppen besitzt (Friedrich *et al.*, 2000; Bamford *et al.*, 2002). Da die Kristallstruktur beider Proteine zeigte, dass sich das zusätzliche N-terminale Häm von SoxA in zu großer Distanz zu den anderen Hämgruppen befindet um eine effiziente Elektronenübertragung zu erlauben (Dambe *et al.*, 2005; Bamford *et al.*, 2002), scheint die unterschiedliche Anzahl von Hämgruppen von untergeordneter Bedeutung für die Funktion des Proteins zu sein. SoxX aus *Alc. vinosum* fehlt wie auch den Proteinen aus *Chlorobaculum tepidum*, *Aquifex aeolicus* und *Rhodopseudomonas palustris* im Gegensatz zu SoxX aus *Rdv. sulfidophilum* und *Pcs. pantotrophus* die Verbindungsschleife zwischen SoxX und SoxA (Bamford *et al.*, 2002). In *Cba. tepidum* wurde kürzlich ein als SoxK bezeichnetes SoxXA-

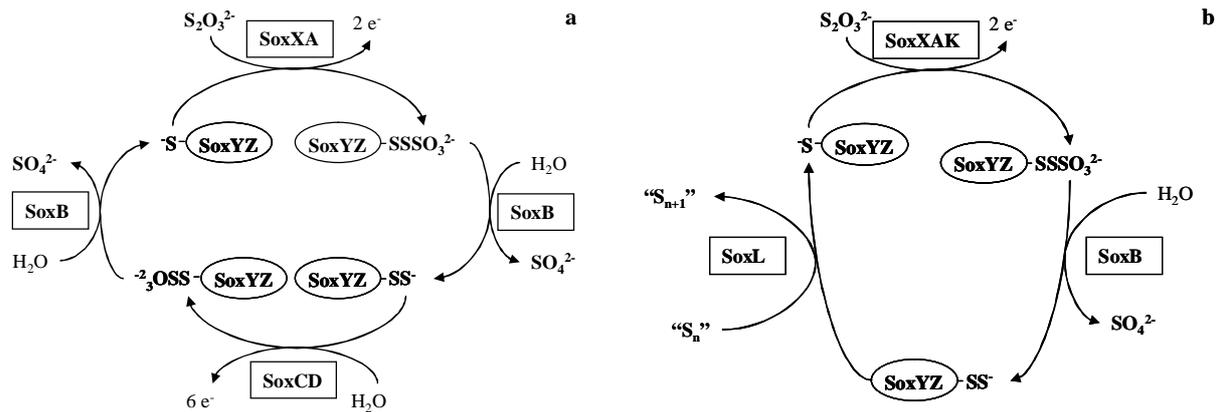


Abbildung 3. Modell des Sox-Systems in *Pcs. pantotrophus* (a) und *Alc. vinosum* (b).

Bindeprotein gefunden, das die Bildung eines stabilen Komplexes zwischen SoxX und SoxA ermöglicht (Ogawa *et al.*, 2008). Ein im Genom direkt stromabwärts von *soxA* liegendes Gen codiert in *Alc. vinosum* für ein Homologes von SoxK, so dass SoxXA in *Alc. vinosum* vermutlich ebenfalls durch das Bindeprotein SoxK zusammengehalten wird. SoxB wurde aus *Alc. vinosum* als monomeres Protein (62 kDa) isoliert und es konnten experimentell die Prozessierung und der Transport über den Tat-Weg nachgewiesen werden (Hensen *et al.*, 2006). SoxB aus *Pcs. pantotrophus* enthält zwei Manganatome pro Monomer (Friedrich *et al.*, 2000), was vermutlich auch für SoxB aus *Alc. vinosum* der Fall ist. SoxYZ wurde ebenfalls als Heterodimer gereinigt (SoxY 12,7 kDa, SoxZ 11,2 kDa) (Hensen *et al.*, 2006). Experimentell konnte gezeigt werden, dass Thiosulfat an den hochkonservierten Cysteinrest am C-Terminus von SoxY gebunden wird. Dieser wird von jeweils zwei Glycinen umrahmt, welche in SoxY aus *Pcs. pantotrophus* aus der Proteinoberfläche herausragen und einen beweglichen Peptidarm bilden, der hohe Flexibilität in der Konformation und damit eine effiziente Interaktion des Substratbindemoleküls mit seinen Komplexpartnern erlaubt (Sauvé *et al.*, 2007). Für SoxY wurde ein Tat-abhängiger Transport ins Periplasma vorhergesagt. Da SoxZ selbst kein Signalpeptid aufweist, wird es vermutlich zusammen mit SoxY cotransportiert, wie das bereits für SoxZ aus *Pcs. pantotrophus* postuliert wurde (Friedrich *et al.*, 2001).

Alle drei beschriebenen Sox-Proteine sind in *Alc. vinosum* *in vivo* essentiell für die Oxidation von Thiosulfat (Hensen *et al.*, 2006). Mutanten, in denen die Gene *soxB*, *soxX* und *soxBX* durch Insertion einer Ω -Kanamycinkassette bzw. *soxY* durch Deletion des Gens inaktiviert wurden, waren nicht mehr in der Lage, Thiosulfat zu Sulfat zu oxidieren. Sowohl SoxYZ als auch SoxB sind *in vitro* in der Oxidation von Thiosulfat unter Reduktion von Cytochrom *c* aktiv (Welte *et al.*, 2009). Beide interagieren dabei sowohl mit SoxXA als auch mit SoxCD

aus *Pcs. pantotrophus*.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse und in Modifikation des von Friedrich *et al.* (2001) postulierten Modells für die Oxidation von Thiosulfat in *Pcs. pantotrophus* wurde für *Alc. vinosum* folgendes Modell vorgeschlagen (Abbildung 3b): Durch SoxXAK wird die initiale Oxidation und die kovalente Bindung des Substrates Thiosulfat an SoxYZ katalysiert. Anschließend spaltet SoxB hydrolytisch Sulfat ab. Im Unterschied zu *Pcs. pantotrophus* besitzt *Alc. vinosum* kein SoxCD, zudem konnte in früheren Versuchen gezeigt werden, dass nur der Sulfonschwefel des Thiosulfat direkt zu Sulfat oxidiert wird, während der Sulfanschwefel als Schwefelkugeln gespeichert wird (Smith & Lascelles, 1966; Trüper & Pfennig, 1966). Dementsprechend wird der am Cysteinrest des SoxY verbleibende Sulfanschwefel im Gegensatz zu der Situation in *Pcs. pantotrophus*, einem Organismus, der keine Schwefelkugeln bildet, auf die Schwefelkugeln übertragen und auf diese Weise SoxYZ für die weitere Oxidation von Thiosulfat regeneriert. Ein Protein, das in diesen Schritt involviert sein könnte, stellt SoxL dar, das von einem stromabwärts von *soxK* liegenden Gen codiert wird (Welte *et al.*, 2009). In einem Hybridassay aus *Pcs. pantotrophus* SoxXA und *Alc. vinosum* SoxYZ und SoxB erhöht die Zugabe von SoxL den Substratumsatz ohne die Elektronenausbeute zu erhöhen, was darauf hindeutet, dass es SoxY regeneriert.

Die Bildung von Tetrathionat im Verhältnis zur vollständigen Oxidation zu Sulfat ist in *Alc. vinosum* stark pH-abhängig, wobei unter leicht sauren Bedingungen mehr Tetrathionat produziert wird (Smith, 1966). Bei der Thiosulfatdehydrogenase (AlvinDRAFT_3173) handelt es sich um ein periplasmatisches, *c*-Typ-Cytochrom mit einem Molekulargewicht von 30 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 4,2, das als Monomer gereinigt wird (Hensen *et al.*, 2006). Die Thiosulfatdehydrogenase katalysiert *in vitro* die Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat mit Ferricyanid als artifiziellem Elektronenakzeptor (Hensen *et al.*, 2006).

2.3 Verwertung von Elementarschwefel

Neben Sulfid, Polysulfiden und Thiosulfat kann *Alc. vinosum* auch Elementarschwefel als Elektronendonator für die anoxygene Photosynthese nutzen (Thiele, 1968; Trüper & Pfennig, 1974). Die formale Wertigkeit von Elementarschwefel ist null (S_0), wobei Elementarschwefel dazu neigt, sich zu verbinden und lange Ketten von unterschiedlicher Länge (S_∞ oder S_n) und Ringe verschiedener Größe (S_n) zu bilden (Steudel, 2000; Steudel & Eckert, 2003). Alle Schwefelallotrope sind hydrophob, nicht durch Wasser benetzbar und kaum löslich in Wasser (Steudel, 1989). Damit unterscheidet sich dieses Substrat deutlich von

den anderen von *Alc. vinosum* genutzten. Die thermodynamisch stabilste Form von Elementarschwefel bei Raumtemperatur und Umgebungsdruck ist zyklischer, orthorhombischer α -Schwefel (α -S₈) (*cyclo*-Oktaschwefel oder S₈-Ringe) (z.B. Roy & Trudinger, 1970; Steudel, 2000). Bei 20 °C hat purer α -S₈ eine grün-gelbe Farbe, die in weiß wechselt, wenn der Schwefel auf -80 °C gekühlt wird (Steudel, 1996). Im Gegensatz dazu bleibt der typische im Handel zu erwerbende Elementarschwefel ("Schwefelblüte") auch nach dem Kühlen auf -80 °C gelb (Steudel, 1996) und besteht hauptsächlich aus S₈-Ringen, einigen Polymerschwefelketten und Spuren von S₇-Ringen, die für die gelbe Farbe verantwortlich sind (Steudel & Holz, 1988). Polymerschwefel besteht aus kettenartigen Makromolekülen, die aus bis zu 100 000 Schwefelatomen bestehen können und enthält wahrscheinlich auch sehr große Ringe (S_n mit n > 50) (Steudel & Eckert, 2003). Ob die molekulare Zusammensetzung des Schwefels eine Rolle bei seiner Verwertung spielt, wurde bisher kaum erforscht und auch über die Mobilisierung und Aufnahme von Elementarschwefel ist wenig bekannt. Prinzipiell sind analog zur Reduktion unlöslicher Elektronenakzeptoren wie zum Beispiel Metallen durch Prokaryoten zwei verschiedene Strategien denkbar (Lloyd, 2003): Entweder besteht ein physischer Kontakt zwischen der Zelle und ihrem unlöslichen Substrat verbunden mit einem direkten Elektronentransfer von der Zelloberfläche zum Substrat über Proteine der äußeren Membran (Myers & Myers, 2001) oder es werden reduzierende Substanzen ausgeschieden, die ohne direkten Kontakt zwischen Zelle und Schwefel am Substrat wirken (Hernandez *et al.*, 2004). Die wenigen vorhandenen Daten zur Schwefelaufnahme bei chemotrophen Schwefeloxidierern wie *Acidithiobacillus thiooxidans* und *Acidithiobacillus ferrooxidans* zeigen, dass diese den ersten Weg nutzen und über glykokalixartige, extrazelluläre polymere Substanzen einen direkten Zell-Schwefelkontakt herstellen (Vogler & Umbreit, 1941; Espejo & Romero, 1987; Bryant *et al.*, 1984; Gehrke *et al.*, 1998). Für *Acidithiobacillus* und *Acidiphilum* wurde vorgeschlagen, dass extrazelluläre Thiolgruppen spezieller Proteine der äußeren Membran den Schwefel mobilisieren und er anschließend als Persulfidschwefel ins Periplasma transportiert wird (Rohwerder & Sand, 2003). Es konnten in *Acidithiobacillus* auch zwei verschiedene Proteine der äußeren Membran identifiziert werden, die an der Ausbildung eines Zell-Schwefelkontaktes und der Aufnahme von Elementarschwefel beteiligt sind (Buonfiglio *et al.*, 1999; Ramírez *et al.*, 2004). Für das grüne Schwefelbakterium *Prosthecochloris vibrioformis* wurde eine Schwefelmobilisierung durch Sulfid postuliert (Borkenstein & Fischer, 2006), was den früheren Ergebnissen von Paschinger *et al.* (1974) für *Chlorobium limicola* entspricht. Es scheint also in unterschiedlichen Organismengruppen unterschiedliche Mechanismen der Elementarschwefelverwertung zu geben.

Zur Verwertung von Elementarschwefel durch anoxygene, phototrophe Bakterien im Allgemeinen und *Alc. vinosum* im Besonderen gibt es bisher allerdings noch keinerlei Erkenntnisse.

2.4 Schwefelkugeln und deren Oxidation zu Sulfit

Bei der Oxidation von Sulfid, Polysulfiden, Thiosulfat und Elementarschwefel treten intrazelluläre Schwefelkugeln als obligates Intermediat auf (Dahl & Prange, 2006; Abbildung 2). Sie sind von einer Proteinhülle aus den drei Proteinen SgpA, SgpB und SgpC umgeben (Schmidt *et al.*, 1971; Brune 1995), deren Signalpeptide für eine extracytoplasmatische Lokalisation der Proteine und damit der Schwefelkugeln sprechen (Pattaragulwanit *et al.*, 1998). Bei den Schwefelkugelproteinen handelt es sich um Strukturproteine ohne enzymatische Funktion, wobei SgpC eine wichtige Rolle bei der Expansion der Schwefelkugeln spielt, während SgpA und SgpB sich teilweise gegenseitig ersetzen können (Pattaragulwanit *et al.*, 1998; Prange *et al.*, 2004). Die Gene der Schwefelkugelproteine liegen in drei verschiedenen Transkriptionseinheiten und werden konstitutiv exprimiert (Prange *et al.*, 2004). Der in den Kugeln abgelagerte Schwefel liegt nicht in kristalliner, sondern in flüssiger Form vor (Hageage *et al.*, 1970), wobei die Dichte des flüssigen Schwefels der Schwefelkugeln mit 1.31 g/cm^{-3} deutlich unter der von flüssigem, reinem Elementarschwefel liegt (1.89 g/cm^{-3} ; Guerrero *et al.*, 1984; Stedel *et al.*, 1990). Dies deutet darauf hin, dass der intrazelluläre Schwefel Komplexe mit einer Komponente mit geringerer Dichte bildet. In Einklang mit dieser Vermutung zeigten Analysen mit XANES (X-ray absorption near edge structure)-Spektroskopie, dass die Schwefelkugeln in *Alc. vinosum* aus Bis-Organylsulfanen der Struktur R-S_n-R bestehen, wobei es starke Hinweise darauf gibt, dass es sich bei dem Rest R um Glutathion oder Glutathionamid handelt (Prange *et al.*, 1999; Prange *et al.*, 2002a; Prange *et al.*, 2002b).

Unklar ist bisher, wie der gespeicherte Schwefel zur weiteren Oxidation aktiviert wird. Es wird vermutet, dass er reduktiv zu Sulfid aktiviert wird (Schedel *et al.*, 1979), welches dann mit Hilfe eines perthiolischen, organischen Trägermoleküls von den periplasmatisch lokalisierten Schwefelkugeln ins Cytoplasma transportiert wird (Dahl *et al.*, 2005). Mit einiger Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei dem Trägermolekül um Glutathionamid, da es eine Amidgruppe am Glycylrest des Glutathion aufweist und besonders resistent gegen Autooxidation ist (Frigaard & Dahl, 2009). Es wurde vor allem als Persulfid in *Alc. vinosum*-Zellen gefunden, die photoautotroph wuchsen (Bartsch *et al.*, 1996). Zudem fanden sich

kürzlich sowohl ein Transporter für den Export (Pittman *et al.*, 2005) als auch für den Import (Suzuki *et al.*, 2005) von Glutathion in *Escherichia coli*. In der vorläufigen Genomsequenz von *Alc. vinosum* finden sich Gene mit Ähnlichkeit zu beiden Transportsystemen (Export: AlvinDRAFT_0243, AlvinDRAFT_0244; Import: AlvinDRAFT_1251, AlvinDRAFT_1252, AlvinDRAFT_1253, AlvinDRAFT_1254; Christiane Dahl, persönliche Mitteilung), was einen Transport von Glutathionamid vom Periplasma ins Cytoplasma und zurück wahrscheinlich macht. Zudem finden sich in unmittelbarer Nähe des Importers im Genom von *Alc. vinosum* zwei Gene, die für eine putative Glutathionamidreduktase codieren (AlvinDRAFT_1145 und AlvinDRAFT_1146; Christiane Dahl, persönliche Mitteilung).

Für die weitere Oxidation zu Sulfit, die im Cytoplasma erfolgt, sind die Sulfitreduktase DsrAB und weitere Dsr-Proteine (DsrEFHCMKLJOPNRS) verantwortlich. Vermutlich wird im Cytoplasma Sulfid von seinem Trägermolekül freigesetzt und in mehreren Schwefelübertragungsreaktionen über DsrEFH und DsrC zur Sulfitreduktase DsrAB transportiert (Cort *et al.*, 2008). Diese arbeitet in Schwefeloxidierern vermutlich in umgekehrter Richtung (Schedel *et al.*, 1979), wobei die bei der Oxidation frei werdenden Elektronen auf den Transmembrankomplex DsrMKJOP übertragen und über diesen in den photosynthetischen Elektronentransport gespeist werden könnten (Dahl *et al.*, 2005). DsrN katalysiert wahrscheinlich die glutaminabhängige Amidierung des Sirohämcofaktors von DsrAB (Lübbe *et al.*, 2006), während für DsrR experimentelle Hinweise gefunden wurden, die darauf hindeuten, dass es an der posttranslationalen Regulation des *dsr*-Operons beteiligt ist (Grimm *et al.*, 2009). Welche Rolle DsrL und DsrS in der Oxidation des gespeicherten Schwefels zu Sulfit spielen, ist noch nicht vollständig geklärt, aber zumindest für DsrL konnte durch *in frame*-Deletion gezeigt werden, dass es für die Schwefeloxidation essentiell ist (Lübbe *et al.*, 2006).

2.5 Oxidation von Sulfit

Auch die enzymatische Katalyse des weiteren Oxidationsschrittes von Sulfit zu Sulfat ist in *Alc. vinosum* noch nicht vollständig geklärt. Eine Möglichkeit wäre, dass Sulfit entweder indirekt APS-Reduktase-vermittelt zu Adenosin-5'-Phosphosulfat und anschließend unter ATP-Bildung durch die ATP-Sulfurylase Sulfat freigesetzt wird (Frigaard & Dahl, 2009; Abbildung 2). Allerdings zeigen Mutanten, in denen die für die APS-Reduktase codierenden Gene *aprAB* inaktiviert wurden, die selben Sulfitoxidationsraten wie der Wildtyp (Dahl, 1996). Auch die Wachstumsraten von Wildtyp und Mutante waren unter diesen Bedingungen

vergleichbar. Allerdings wächst der Wildtyp bei Überbelichtung deutlich schneller als die Mutante, was darauf hindeutet, dass ein zweiter verfügbarer Stoffwechselweg zur Sulfitoxidation unter diesen Bedingungen eine bessere Versorgung mit Reduktionskraft ermöglicht (Sanchez *et al.*, 2001).

Als zweite Möglichkeit kommt in Frage, dass *Alc. vinosum* Sulfit direkt durch eine molybdänhaltige Sulfit-Akzeptor-Oxidoreduktase zu Sulfat oxidiert (Frigaard & Dahl, 2009). Bei der am besten charakterisierten, bakteriellen Sulfitoxidase handelt es sich um SorAB aus *Sta. novella* (Kappler, 2008). Sie ist periplasmatisch lokalisiert und stellt ein Heterodimer aus einer großen MoCo-Dimer-Untereinheit und einer kleinen Cytochrom *c*-Untereinheit dar (Frigaard & Dahl, 2009). Während der Katalyse überträgt sie Elektronen auf ein einzelnes Häm *c*₅₅₂, das in der kleinen Untereinheit lokalisiert ist von wo aus sie weiter auf ein Cytochrom *c*₅₅₀ aus dem selben Organismus übertragen werden. Allerdings zeigte sich mit der annähernden Fertigstellung der Sequenzierung des Genoms von *Alc. vinosum* 180^T, dass in *Alc. vinosum* kein Homologes zu SorAB vorhanden ist (Christiane Dahl, persönliche Mitteilung), was den Weg der direkten Oxidation von Sulfit über eine Sulfit-Akzeptor-Oxidoreduktase in *Alc. vinosum* unwahrscheinlich macht.

Für den Sox-Multienzymkomplex von *Pcs. pantotrophus* wurde beschrieben, dass er *in vitro* in Anwesenheit der Proteine SoxYZ, SoxXA und SoxB Sulfit als Substrat nutzen kann, welches zu Sulfat oxidiert wird (Friedrich *et al.*, 2001). Auch in *Alc. vinosum* gibt es Hinweise auf eine Sulfitoxidation mittels des Sox-Multienzymkomplexes. Die Mutante *Alc. vinosum* Δ *soxY*, in der das Gen *soxY* nahezu vollständig deletiert wurde, setzt bei Anzucht mit Sulfid als einzigem Elektronendonator bei der Oxidation der im Zuge der Sulfidoxidation gebildeten intrazellulären Schwefelkugeln Sulfit als nachweisbares Zwischenprodukt frei (Hensen, 2006). Zudem zeigt sie bei Anzucht mit extern zugesetztem Sulfit als einzigem Elektronendonator eine im Vergleich zu der des Wildtyps um 60 % reduzierte Sulfitoxidationsrate (Franz, 2005). Ob auch die Proteine SoxB und SoxXA an der Oxidation von Sulfit beteiligt sind und diese somit vollständig durch den Sox-Multienzymkomplex bewerkstelligt wird, konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden.

3 Weitere Vertreter der *Chromatiaceae* und *Ectothiorhodospiraceae*

Weitere wichtige Vertreter der anoxygenen, phototrophen Schwefelpurpurbakterien sind *Thiocapsa roseopersicina*, *Halorhodospira halophila* und *Halorhodospira abdelmalekii*.

3.1 *Thiocapsa roseopersicina*

Bei *Tca. roseopersicina* handelt es sich wie bei *Alc. vinosum* um einen Vertreter der *Chromatiaceae*. Unter dem Mikroskop erscheint er als unbewegliche Kokken mit 1-3 µm Durchmesser (Imhoff & Caumette, 2005). Die Zellen sind von einer dicken Schleimkapsel umgeben. Ihr photosynthetisches Membransystem gehört dem vesikulären Typ an und sie sind zu photolithoautotrophen Wachstum mit Sulfid, Polysulfiden (Visscher *et al.*, 1990), Thiosulfat und Elementarschwefel unter anaeroben Bedingungen befähigt (Imhoff & Caumette, 2005). Hierbei werden intrazelluläre Schwefelkugeln, die wie bei *Alc. vinosum* aus Polymerschwefelketten mit organischen Resten bestehen (Prange *et al.*, 2002a), als Intermediat gebildet. Wie in *Alc. vinosum* sind diese von Schwefelkugelproteinen umgeben, wobei *Tca. roseopersicina* nur zwei Schwefelkugelproteine besitzt (Brune, 1995), von denen eines zu SgpA und SgpB, das andere zu SgpC homolog ist (Frigaard & Dahl, 2009). Auch in *Tca. roseopersicina* wird der gespeicherte Schwefel weiter zu Sulfat oxidiert (Imhoff & Caumette, 2005). Zudem kann der Organismus unter aeroben Bedingungen im Dunkeln chemolithoautotroph wachsen.

3.2 *Halorhodospira halophila*

Im Gegensatz zu *Alc. vinosum* und *Tca. roseopersicina* gehört *Hlr. halophila* zur Familie der *Ectothiorhodospiraceae*. Es handelt sich um kurze Spirillen mit einer Größe von 5 x 0,8 µm, die durch je ein Flagellum an jedem Ende beweglich sind (Imhoff, 2005b). Der Organismus ist halophil und benötigt für optimales Wachstum Konzentrationen von 11 - 32 % NaCl, Temperaturen zwischen 30 und 47 °C und einen pH-Wert von 8,5 - 9,0. Seine natürlichen Habitate sind Salz- und Sodaseen. Das photosynthetische Membransystem von *Hlr. halophila* besteht aus in Lamellen angeordneten Stapeln von Membranen, der Organismus ist strikt anaerob und wächst photoautotroph mit Sulfid und Thiosulfat. Er bildet im Gegensatz zu *Alc. vinosum* und *Tca. roseopersicina* extrazelluläre Schwefelkugeln, die aber wie bei diesen aus Polymerschwefelketten mit organischen Resten bestehen (Prange *et al.*, 2002a). Diese werden vermutlich vollständig zu Sulfat oxidiert (Imhoff, 2005b).

Neben *Alc. vinosum* 180^T ist *Hlr. halophila* SL1 bisher das einzige Schwefelpurpurbakterium, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Accessionnummer: NC_008789), so dass auf Basis dieser Daten einige Vermutungen zu seinem Schwefelstoffwechsel angestellt werden können. *Hlr. halophila* enthält ein Homologes (Hhal_1665) zur SQR aus *Rba. capsulatus*, so

dass Sulfid in diesem Organismus über eine SQR oxidiert werden könnte (Frigaard & Dahl, 2009). Auch für einen Sox-Komplex codierende Gene sind in *Hlr. halophila* vorhanden. Es finden sich wie bei *Alc. vinosum* die Gene *soxBYZ* (Hhal_2324, Hhal_2326, Hhal_2327) und ein fusioniertes *soxA* (Hhal_2333), aber kein *soxCD*, was für eine Thiosulfatoxidation nach dem für *Alc. vinosum* aufgestellten Modell spricht (Frigaard & Dahl, 2009). Die Oxidation gespeicherten Schwefels erfolgt in *Hlr. halophila* vermutlich ebenfalls vergleichbar zu *Alc. vinosum* über die Dsr-Proteine, da der Organismus ein *dsr*-Operon mit den Genen *dsrABEFHCMKLJOPN* (Hhal_2336 bis Hhal_2348) besitzt. Wie in *Alc. vinosum* gibt es in *Hlr. halophila* kein Homologes zur Sulfitoxidase SorAB aus *Sta. novella* (Frigaard & Dahl, 2009). Der Schwefelstoffwechsel scheint also trotz der unterschiedlichen Lokalisation der Schwefelkugeln in beiden Organismen sehr ähnlich zu verlaufen (vergleiche auch Abbildung 2).

3.3 *Halorhodospira abdelmalekii*

Auch *Hlr. halophila* ist ein Vertreter der *Ectothiorhodospiraceae*. Unter dem Mikroskop erscheint der Organismus als Spirillen oder Stäbchen mit einer Größe von 0,9 - 1,2 x 4-6 µm oder länger (Imhoff & Süling, 1996). Die Zellen sind durch bipolare, ummantelte Flagellen beweglich. Im Gegensatz zu *Alc. vinosum*, *Tca. roseopersicina* und *Hlr. halophila* haben Kulturen von *Hlr. abdelmalekii* eine blassgrüne Farbe. Auch in diesem Vertreter der Gattung *Halorhodospira* ist das photosynthetische Membransystem in lamellenartigen Stapeln von Membranen angeordnet. Der Organismus wächst unter strikt anoxischen Bedingungen in Anwesenheit von Sulfid, anorganischem Carbonat und organischen Kohlenstoffquellen, wobei es sich bei diesen um Acetat, Propionat, Pyruvat, Succinat, Fumarat und Malat handeln kann. Dabei bildet er extrazelluläre Schwefelkugeln, die ebenfalls aus Bis-Organylsulfanen bestehen (Prange *et al.*, 2002a). Diese werden nicht weiter zu Sulfat oxidiert (Then & Trüper, 1983). Für optimales Wachstum benötigt der Organismus hohe Salzkonzentrationen (12-18 % NaCl), eine Temperatur von 30 - 44 °C und einen pH-Wert von 8,0 - 9,2 (Imhoff, 2005b). Seine natürlichen Habitats sind Salz- und Sodaseen.

4 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Der erste beschäftigt sich mit dem Sox-Multienzymkomplex von *Alc. vinosum*. Es sollte untersucht werden, inwieweit neben SoxYZ

auch die Proteine SoxB und SoxXA in die Oxidation von Sulfit involviert sind und damit geklärt werden, ob es sich bei dem Sox-Komplex um das essentielle System zur Sulfitoxidation in *Alc. vinosum* handelt. Zudem sollten erste Erkenntnisse zur transkriptionalen und translationalen Regulation der *sox*-Gene gewonnen werden. Bisher wurden zahlreiche Experimente zur physiologischen Rolle und zur Biochemie des Sox-Systems in *Alc. vinosum* durchgeführt, während über die Regulation so gut wie nichts bekannt ist.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Verwertung von Elementarschwefel durch *Alc. vinosum*, *Tca. roseopersicina*, *Hlr. halophila* und *Hlr. abdelmalekii* untersucht werden, wobei *Alc. vinosum* hier im Vordergrund stand. Mit Hilfe von X-ray absorption near edge structure-Spektroskopie sollte geklärt werden, ob die Speziation des Elementarschwefels Einfluss auf dessen Verwertung hat. Auch der Frage, ob für die Aufnahme von Elementarschwefel in *Alc. vinosum* direkter Zell-Schwefelkontakt notwendig ist oder der Elementarschwefel durch lösliche Substanzen in Distanz zur Zelle mobilisiert wird, sollte nachgegangen werden. Gegebenenfalls sollte geklärt werden, durch welche Mechanismen der Zell-Schwefelkontakt hergestellt wird bzw. für die Mobilisierung des Elementarschwefels verantwortliche Substanzen identifiziert werden. Zusätzlich sollte der Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Aufnahme von Elementarschwefel in *Alc. vinosum* untersucht werden.

Material & Methoden

1 Chemikalien, Enzyme, Kits, sonstige Materialien und Software

1.1 Chemikalien

30 % Acrylamid/ Bisacrylamid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Anthron	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
EGTA	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Methansulfonsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Monobromobiman	Fluka (München, Deutschland)
Nonidet P40	Fluka (München, Deutschland)
Rifampicin	Fluka (München, Deutschland)
4 x Rotiload 1	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Zwittergent 3-12	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

1.2 Enzyme

CIAP	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
RNasin RNase Inhibitor	Promega (Mannheim, Deutschland)
T4-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

1.3 Kits

BCA Protein Assay	Pierce (Waltham, USA)
GC-RICH PCR System	Roche (Mannheim, Deutschland)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAgen RT-PCR Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Riboprobe System T7	Promega (Mannheim, Deutschland)
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden, Deutschland)

1.4 Sonstige Materialien

ABgene PCR-Plates	Thermo Scientific (Egelsbach, Deutschland)
Adhesive PCR Film	Thermo Scientific (Egelsbach, Deutschland)
Anaerocult A	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Anaerotest	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Cryo-Tubes	Nunc (Langenselbold, Deutschland)
1-kb-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
1-kb-RNA-Leiter	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Dialyseschläuche	Spectrapor (Breda, Niederlande)
Kaptonfolie Typ 7010	CWC Klebetechnik, Frankenthal, Deutschland
Kohlendioxid	Air Products (Hattingen, Deutschland)
Nitrocellulose-Filter	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Polypropylenfolie	SPEX Industries, Metuchen, USA)
Sterilfilter (0,2 µl)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Stickstoff	Air Products (Hattingen, Deutschland)
Whatman 3MM-Papier	Whatman (Maidstone, United Kingdom)

1.5 Computersoftware und Onlinetools

BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
BProm	http://linux1.softberry.com/berry.phtml
Clone Manager 5.03	Scientific & Educational Software
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html
Microsoft Office 2003	Microsoft Corporation
Neuronal Networks Promoter Prediction	http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
PC 1000	Thermo Separation Products Inc.
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm
Reputer	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/reputer/
iQ Optical System Software Version 3.1	Biorad (München, Deutschland)

2 Organismen, Oligonukleotide und Plasmide

2.1 Organismen

Tabelle 1. Verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genetische Marker	Referenz
<i>Allochromatium vinosum</i>		
<i>Allochromatium vinosum</i> Rif50	Rif ^r	Lübbe <i>et al.</i> , 2006
<i>Allochromatium vinosum</i> DSM180 ^T	Typenstamm	Pfennig & Trüper, 1971
<i>Allochromatium vinosum</i> <i>soxB</i> ::Ω-Km	DMSZ 185; Km ^r ; <i>soxB</i> ::Ω-Km	Hensen <i>et al.</i> , 2006
<i>Allochromatium vinosum</i> <i>soxX</i> ::Ω-Km	DMSZ 185; Km ^r ; <i>soxX</i> ::Ω-Km	Hensen <i>et al.</i> , 2006
<i>Allochromatium vinosum</i> Δ <i>soxY</i>	Rif50; Rif ^r ; Δ <i>soxY</i>	Hensen <i>et al.</i> , 2006
<i>Allochromatium vinosum</i> <i>aprAB</i> ::Ω-Km	Rif50; Rif ^r ; Km ^r ; <i>aprAB</i> ::Ω-Km	diese Arbeit, siehe auch Dahl, 1996
<i>Allochromatium vinosum</i> Δ <i>soxY</i> - <i>aprAB</i> ::Ω-Km	Rif50; Rif ^r ; Km ^r ; Δ <i>soxY</i> ; <i>aprAB</i> ::Ω-Km	diese Arbeit
<i>Allochromatium vinosum</i> Tl- <i>soxB</i>	Rif50; Rif ^r ; Km ^r ; pK235- <i>soxB</i> in <i>soxB</i>	diese Arbeit
<i>Allochromatium vinosum</i> Tl- <i>soxX</i>	Rif50; Rif ^r ; Km ^r ; pK235- <i>soxX</i> in <i>soxX</i>	diese Arbeit
<i>Allochromatium vinosum</i> Tl- <i>soxY</i>	Rif50; Rif ^r ; Km ^r ; pK236- <i>soxY</i> in <i>soxY</i>	diese Arbeit

Escherichia coli

<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ ; Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15; Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169; <i>recA</i> ; <i>endA1</i> ; <i>hsdR17</i> (rk ⁻ mk ⁺); <i>supE44</i> ; λ <i>thi-1</i> ; <i>gyrA</i> ; <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> S17-1	294 (<i>recA pro res mod</i> ⁺) Tp ^r ; Sm ^r (pRP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7)	Simon <i>et al.</i> , 1983
Sonstige		
<i>Halorhodospira halophila</i> SL1 DSMZ 244 ^T		Raymond & Sistrom, 1969
<i>Thiocapsa roseopersicina</i> BBS		Bogorov, 1974
<i>Halorhodospira abdelmalekii</i> DSMZ 2110 ^T		Imhoff & Trüper, 1981

2.2 Oligonukleotide

Tabelle 2. Verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	5` - 3` Sequenz
RNA-soxB-std-for	taatacgactcactatagggatccatgacgccgacgaa
RNA-soxB-std-rev	ctgctgcatatcaccgacac
RNA-soxX-std-for	taatacgactcactatagggaatcgatcgctatccaccac
RNA-soxX-std-rev	cagcgagggtagtggttcat
RNA-soxY-std-for	taatacgactcactataggcgcaagacaagagaggaga
RNA-soxY-std-rev	tgacttcggtgcttctgctg
RNA-soxB-for	gatgacgtaaggctcgaagg
RNA-soxB-rev	agttcacctatggcgacgag
RNA-soxX-for	gaccttcccgacgacctc
RNA-soxX-rev	acggaaaacgtgtctgcatc
RNA-soxY-for	ggcgtcacttccatcagtct
RNA-soxY-rev	gacgctcttggcgttcttat
lacZp_soxB_for	atcctcctgggcatcggttaaagcttttgctc
lacZp_soxB_rev	cagcgagggtagtggttcatgctgacgatggc
lacZp_soxX_for	acctctgtcgacttgatgacgtaaggctcgaa
lacZp_soxX_rev	cgaaatcctctcgcataagctttgacgt
lacZp_soxY_for	gcataggtcgacaattcctgcgaccctc
lacZp_soxY_rev	tttgcgttggcttcgcaagcttttcttc
pK18mobsacB-for	gctgaagccagttaccttcg
pK18mobsacB-rev	gctataatgaccccgaagca
aprB-for	tgctgggagtgtactcctg
aprA-rev	ccgtcctcgcattgtctt

2.3 Plasmide

Tabelle 3. Verwendete Vektoren.

Plasmid	Genotyp	Referenz
pK18mobsacB	Km ^r , Mob ⁺ , <i>sacB</i> , <i>oriV</i> , <i>oriT</i> , <i>lacZa</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pPR-IBA 1	Ap ^r , Strep-tag II (c-terminal)	IBA Biotagnology
pBBR1MCS-2	Km ^r , Mob ⁺ , <i>rep</i> , <i>lacZa</i>	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pPR-SoxYZ_strep	Ap ^r , <i>XbaI</i> - <i>NcoI</i> -Fragment (<i>soxYZ</i>) in pPR-IBA 1, Strep-tag II (c-terminal)	diese Arbeit
pSoxYZ_strep	Km ^r , Mob ⁺ , <i>rep</i> , <i>lacZa</i> , <i>XbaI</i> - <i>HindIII</i> -Fragment aus pPR-SoxYZ_strep, Strep-tag II (c-terminal)	diese Arbeit
pPHU235	Broad-host-range <i>lacZ</i> fusion vector	Hübner <i>et al.</i> , 1991
pPHU236	Broad-host-range <i>lacZ</i> fusion vector	Hübner <i>et al.</i> , 1991
pK235	Km ^r , Mob ⁺ , <i>sacB</i> , <i>oriV</i> , <i>oriT</i> , <i>lacZa</i> , <i>EcoRI</i> - <i>SalI</i> -Fragment (<i>lacZ</i>) aus pPHU235	diese Arbeit
pK236	Km ^r , Mob ⁺ , <i>sacB</i> , <i>oriV</i> , <i>oriT</i> , <i>lacZa</i> , <i>EcoRI</i> - <i>SalI</i> -Fragment (<i>lacZ</i>) aus pPHU236	diese Arbeit
pK235- <i>soxB</i>	Km ^r , Mob ⁺ , <i>sacB</i> , <i>oriV</i> , <i>oriT</i> , <i>lacZa</i> , <i>PstI</i> - <i>HindIII</i> -Fragment (Promotorregion <i>soxB</i>) in pK235	diese Arbeit
pK235- <i>soxX</i>	Km ^r , Mob ⁺ , <i>sacB</i> , <i>oriV</i> , <i>oriT</i> , <i>lacZa</i> , <i>PstI</i> - <i>HindIII</i> -Fragment (Promotorregion <i>soxX</i>) in pK235	diese Arbeit
pK236- <i>soxY</i>	Km ^r , Mob ⁺ , <i>sacB</i> , <i>oriV</i> , <i>oriT</i> , <i>lacZa</i> , <i>PstI</i> - <i>HindIII</i> -Fragment (Promotorregion <i>soxY</i>) in pK236	diese Arbeit
pNTS35	Km ^r -Kassette (<i>EcoRI</i>) aus pHP45Ω-Km in <i>PvuII</i> in <i>aprB</i>	Dahl, 1996

3 Mikrobiologische Methoden

3.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte bei 37 °C in Röhrchen mit Flüssigkultur unter Schütteln bei 180 rpm oder auf Agarplatten. Es wurde LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet. Nach Transformationen wurde das nährstoffreichere 2 x YT-Medium verwendet (Sambrook *et al.*, 1989).

LB-Medium

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
ad 1 L dH₂O

2 x YT-Medium

16 g Trypton
10 g Hefeextrakt
5 g NaCl
ad 1 L dH₂O

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren (20 min bei 121 °C) 15 g Agar zugesetzt. Antibiotika zur Selektion nach Transformationen wurden dem noch etwa 50 °C warmen Medium je nach Bedarf in den in Tabelle 4 aufgeführten Konzentrationen zugesetzt. Flüssigen Nährmedien wurde kurz vor dem Gebrauch das entsprechende Antibiotikum aus einer sterilen Stammlösung hinzugefügt.

Tabelle 4. Antibiotikakonzentrationen, die zur Selektion von *E. coli* nach Transformationen eingesetzt wurden.

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg mL ⁻¹
Kanamycin	50 µg mL ⁻¹

3.2 Kultivierung von *Allochromatium vinosum*

3.2.1 Nährmedien für die Anzucht und Aufbewahrung von *Alc. vinosum*

Für die Anzucht von *Alc. vinosum* wurden RCV-Medium (Weaver *et al.*, 1975) und Nullmedium (Hensen *et al.*, 2006) verwendet.

RCV-Medium

50 mL RÄH-Medium
0,5 g Hefeextrakt
1,8 g NaOH
ad 1 L dH₂O

RÄH-Medium

60 g Malat
24 g NH₄Cl
4 g MgSO₄ × 7 H₂O
1,4 g CaCl₂ × 2 H₂O
20 mL 10× Spurenelementlösung SL12
ad 1 L dH₂O

KPP-Puffer

180 mM K₂HPO₄-KH₂PO₄-Puffer, pH 7,0

10× Spurenelementlösung SL12 (nach Pfennig und Trüper, 1992)

30 g EDTA-di-Natrium-Salz
11 g FeSO₄ × 7 H₂O
3 g H₃BO₃
1,9 g CoCl₂ × 6 H₂O
0,5 g MnCl₂ × 4 H₂O
0,42 g ZnCl₂
0,24 g NiCl₂ × 6 H₂O
0,18 g Na₂MoO₄
0,02 g CuCl₂ × 2 H₂O
ad 1 L dH₂O

Der KPP- Puffer wurde getrennt vom restlichen RCV-Medium autoklaviert und erst vor dem Gebrauch zugegeben. Zur Selektion und Kultivierung von *Alc. vinosum*-Mutanten wurde dem Medium vor der Verwendung Antibiotikum in den in Tabelle 5 aufgeführten Konzentrationen zugesetzt.

Tabelle 5: Zur Anzucht von *Alc. vinosum*-Mutanten eingesetzte Antibiotikakonzentrationen.

Antibiotikum	Endkonzentration
Kanamycin	20 µg ml ⁻¹
Rifampicin	50 µg ml ⁻¹

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem RCV-Medium ohne KPP-Puffer vor dem Autoklavieren 15 g Agar zugefügt und der KPP-Puffer erst nach dem Abkühlen auf 55 °C zugegeben. Die so hergestellten Agarplatten wurden ausschließlich für die Konjugationsansätze zwischen *E. coli* und *Alc. vinosum* verwendet.

Nullmedium

8 L Salzlösung
1 L Carbonatlösung
1 L Phosphatlösung

Salzlösung

3,3 g KCl
3,3 g MgCl₂ × 6 H₂O
4,3 g CaCl₂ × 2 H₂O
3,3 g NH₄Cl
10 mL 10× SL12
ad 8 L dH₂O

Carbonatlösung

3,3 g KH₂PO₄
ad 1 L dH₂O

Phosphatlösung

15 g NaHCO₃
ad 1 L dH₂O

Die Salz-, Carbonat- und Phosphatlösung wurden getrennt voneinander autoklaviert (60 min bei 121 °C). Nach dem Abkühlen wurden Carbonat- und Phosphatlösung unter Stickstoffbegasung zur Salzlösung gegeben, wobei die ursprünglich klare Lösung trüb wurde. Anschließend wurde das Medium mit Kohlendioxid durchblasen, bis es wieder seinen klaren Zustand erreichte. Zu diesem Zeitpunkt lag der pH-Wert der Lösung etwa bei pH 6,5 - 6,8. Das fertige Medium wurde in sterile Schraubdeckelflaschen gefüllt und bei Raumtemperatur gelagert. Vor Verwendung wurde dem Nullmedium in den gewünschten Konzentrationen Sulfid, Thiosulfat oder Sulfit zugegeben. Deren Natriumsalze wurden in dH₂O in 1 M Stammlösungen angesetzt, autoklaviert (20 min bei 121 °C) und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

Nach Konjugationen wurden zur Selektion auf positive Klone Phytageplatten verwendet.

Phytageplatten

6,25 mL	RÄH-Medium	6 mL	KPP-Puffer
62 mg	Hefeextrakt	325 µL	Sulfid-Futterlösung
225 mg	NaOH	250 µL	1 M Natriumacetat
625 mg	NaCl	250 µL	1M Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O
1,25 g	Phytage		
ad 125 mL	dH ₂ O		
pH 7,0			

KPP-Puffer, Sulfid-Futterlösung, 1 M Natriumacetat und 1 M Na₂S₂O₃ × 5 H₂O wurden getrennt autoklaviert und kurz vor dem Gießen der Platten zugegeben. Zudem wurden die Antibiotika, gegen die die verwendeten Mutanten Resistenzen zeigten, in entsprechenden Konzentrationen (siehe Tabelle 5) zugesetzt.

Sulfid-Futterlösung

3,1 g	HNaS × H ₂ O
5,0 g	NaHCO ₃
ad 100 mL	dH ₂ O

Die Lösung wurde autoklaviert (20 min bei 121 °C) und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.2 Kulturverfahren für *Alc. vinosum*

In der Regel wurde *Alc. vinosum* als Flüssigkultur in randvollen 100 mL Kulturflaschen mit gasdichtem Schraubverschluss photoorganoheterotroph in RCV-Medium angezogen. Das Medium, dem Antibiotika zugesetzt wurden, gegen die Resistenzen seitens der Mutante vorlagen, wurde 10 %ig mit der Vorkultur beimpft und bei 30 °C im Lichtbrutschrank für 3-7 Tage inkubiert. Bei schlechtem Wachstum der Kulturen wurden den Kulturflaschen 200 µL Sulfid-Futterlösung zugegeben.

Auf Agarplatten wurde *Alc. vinosum* unter anoxischen Bedingungen im Anaerobentopf bei 30 °C für 5-14 Tage im Licht kultiviert. Das anoxische Milieu im Anaerobentopf wurde durch Anaerocult A erzeugt. Die Entstehung des O₂-freien Milieus wurde durch die Zugabe eines angefeuchteten Indikatorstäbchens (Anaerotest) überprüft.

Kulturen von *Alc. vinosum* wurden mikroskopisch auf ihre Reinheit überprüft. Außerdem wurden die Kulturen bei jedem Überimpfen auf LB-Platten ausplattiert und bei 37 °C unter oxidischen Bedingungen auf Kontaminationen überprüft.

3.2.3 Aufbewahrung von *Alc. vinosum*

Zur längerfristigen Konservierung wurden Stickstoffkulturen angelegt. Dafür wurden 100 mL einer vier Tage alten Kultur für 10 min bei 4000 g zentrifugiert und anschließend in 6 mL Rücklauf resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit der gleichen Menge sterilem 10 % DMSO vermischt und in 2 ml Cryo-Gefäße mit Schraubverschluss überführt. Diese wurden in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3 Kultivierung von *Tca. roseopersicina*

3.3.1 Nährmedium für die Anzucht von *Tca. roseopersicina*

Tca. roseopersicina wurde in Pfennigs Medium (Pfennig & Trüper, 1992) kultiviert. Pfennigs Medium entspricht dem in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Nullmedium, dem zusätzlich zur Carbonat- und Phosphatlösung nach den Autoklavieren eine Sulfidlösung zugefügt wird. Dem Medium wurden zudem 0,001 % Vitamin B12 zugesetzt.

Sulfidlösung

4 g HNaS × H₂O
ad 250 mL dH₂O

3.3.2 Kulturverfahren für *Tca. roseopersicina*

Tca. roseopersicina wurde als Flüssigkultur in randvollen 1 L Kulturflaschen mit gasdichtem Schraubverschluss photolithoautotroph in Pfennigs Medium mit Vitamin B12 angezogen. Die Kulturen wurden 10 %ig angeimpft und bei 30 °C im Lichtbrutschrank für 3-7 Tage inkubiert.

3.4 Kultivierung von *Hlr. halophila*

3.4.1 Nährmedium für die Anzucht von *Hlr. halophila*

Hlr. halophila wurde in Medium für extrem Halophile (Imhoff, 1992) angezogen.

Medium für extrem Halophile

0,8 g	KH ₂ PO ₄
2 g	Natriumacetat
1 g	Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O
130 g	NaCl
1 mL	SLA
375 mL	Carbonatpuffer
ad 975 mL	dH ₂ O

Carbonatpuffer

1 M Na ₂ CO ₃ / NaHCO ₃ -Puffer, pH 9,0	
5 mL	2 % (w/ v) MgCl ₂ × 7 H ₂ O
5 mL	1 % (w/ v) CaCl ₂ × 2 H ₂ O
5 - 10 mL	5 % (w/ v) HNaS × H ₂ O
4 mL	20 % (w/ v) NH ₄ Cl

Spurenelementlösung SLA (nach Imhoff, 1992)

1,8 g	FeCl ₂ × 4 H ₂ O
250 mg	CoCl ₂ × 6 H ₂ O
10 mg	NiCl ₂ × 6 H ₂ O
10 mg	CuCl ₂ × 2 H ₂ O
70 mg	MnCl ₂ × 4 H ₂ O
100 mg	ZnCl ₂
500 mg	H ₃ BO ₃
30 mg	Na ₂ MoO ₄
10 mg	Na ₂ SeO ₃ × 5 H ₂ O
ad 1 L	dH ₂ O

Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Sulfid und Ammoniumchlorid wurden nach dem Autoklavieren zugegeben.

3.4.2 Kulturverfahren für *Hlr. halophila*

Hlr. halophila wurde als Flüssigkultur in randvollen 1 L Kulturflaschen mit gasdichtem Schraubverschluss photomixotroph in Medium für extrem Halophile angezogen. Die Kulturen wurden 10 %ig angeimpft und bei 40 °C im Lichtbrutschrank für 3-7 Tage inkubiert. Hierbei wurden die Deckel leicht geöffnet, um die Ausdehnung des Mediums bei 40 °C zu erlauben.

3.5 Kultivierung von *Hlr. abdelmalekii***3.5.1 Nährmedium für die Anzucht von *Hlr. abdelmalekii***

Hlr. abdelmalekii wurde in einem abgewandelten Medium für extrem Halophile (Imhoff, 1992) angezogen. Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Sulfid, Ammoniumchlorid und die sterilfiltrierte Vitaminlösung wurden nach dem Autoklavieren zugegeben.

Medium für extrem Halophile

0,8 g	KH ₂ PO ₄
2 g	Natriumacetat
13 g	NaSO ₄
117 g	NaCl
1 mL	SLA
200 mL	Carbonatpuffer
ad 975 mL	dH ₂ O

Carbonatpuffer

1 M Na ₂ CO ₃ / NaHCO ₃ -Puffer, pH 9,0	
5 mL	2 % (w/ v) MgCl ₂ × 7 H ₂ O
5 mL	1 % (w/ v) CaCl ₂ × 2 H ₂ O
5 - 10 mL	5 % (w/ v) HNaS × H ₂ O
4 mL	20 % (w/ v) NH ₄ Cl
1 mL	Vitaminlösung

Vitaminlösung

10 mg mL ⁻¹	Biotin
35 mg mL ⁻¹	Nikotinsäureamid
30 mg mL ⁻¹	Thiamin-HCl × 2 H ₂ O
20 mg mL ⁻¹	<i>p</i> -Aminobenzoessäure
10 mg mL ⁻¹	Pyridoxalhydrochlorid
5 mg mL ⁻¹	Vitamin B12

3.5.2 Kulturverfahren für *Hlr. abdelmalekii*

Hlr. abdelmalekii wurde als Flüssigkultur in randvollen 1 L Kulturflaschen mit gasdichtem Schraubverschluss photomixotroph in abgewandeltem Medium für extrem Halophile angezogen. Die Kulturen wurden 10 %ig angeimpft und bei 40 °C im Lichtbrutschrank für 3-7 Tage inkubiert. Hierbei wurden die Deckel leicht geöffnet, um die Ausdehnung des Mediums bei 40 °C zu erlauben.

3.6 Kulturverfahren zur Bestimmung des Umsatzes reduzierter Schwefelverbindungen**3.6.1 Kultivierung im Fermenter**

Die Versuche zum Umsatz reduzierter Schwefelverbindungen durch *Alc. vinosum* Rif50, *Alc. vinosum* DSM 180^T, verschiedene *Alc. vinosum*-Mutanten, *Tca. roseopersicina*, *Hlr. halophila* und *Hlr. abdelmalekii* wurden in einem temperierbaren Glasfermenter mit 1,5 L Kulturvolumen durchgeführt. Der Glasdeckel des Fermenters hatte sechs Anschlüsse. Der pH-Wert der Kultur wurde während des Fermenterlaufs mit Hilfe einer pH-Elektrode, die an eine pH-Regulationseinheit (Mostec, Liestal, Schweiz) angeschlossen war, bestimmt. Die Regelung des pH-Wertes durch Zufuhr von 1 M HCl oder 1 M Na₂CO₃ erfolgte manuell über zwei 10 mL Spritzen, die durch ein Septum im Fermenterdeckel gestochen wurden. Um für eine anoxische Atmosphäre im Fermenterinneren zu sorgen, wurde über einen mit Wattefilter

ausgestatteten Schlauch, eine mit Stickstoff gefüllte Gummiblase angeschlossen. Die Probenahme erfolgte über einen in das Kulturmedium ragenden Entnahmeschlauch. Der fünfte, mit einem Glasdeckel versehene Anschluss diente zur Befüllung des Fermenters mit Medium und Vorkultur. Die sechste Öffnung wurde mit einem Deckel mit Gummidichtung verschlossen, da sie für den Betrieb des Fermenters nicht nötig war. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4 dargestellt.

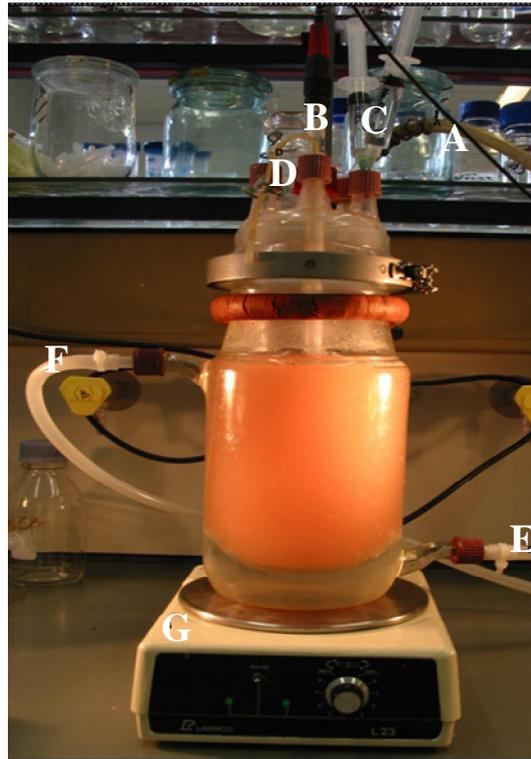


Abbildung 4. Versuchsaufbau zur Bestimmung des Umsatzes reduzierter Schwefelverbindungen durch *Alc. vinosum*. A: Begasung; B: pH-Elektrode; C: pH-Regulation; D: Probenahme; E: Temperierung Zulauf; F: Temperierung Ablauf; G: Magnetrührer

Der Fermenter mit Magnetrührstab, Begasungs- und Probenahmeschlauch und eingesetzter pH-Elektrode und die zur pH-Regulation benötigte Säure und Base wurden autoklaviert (20 min bei 121 °C). Die Vorkultur wurde für *Alc. vinosum* photoorganoheterotroph, für *Tca. roseopersicina* photolithoautotroph mit Sulfid und für *Hlr. halophila* und *Hlr. abdelmalekii* photoorganoheterotroph in einem Volumen von 250 mL angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase in sterilen Zentrifugenbechern (500 mL) für 10 min bei 10000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in einem minimalen Rücklaufvolumen resuspendiert und unter Stickstoffatmosphäre in den zuvor mit Nullmedium befüllten Fermenter gegeben. Während des Versuchs wurde der Fermenter über ein Wasserbad auf

30 °C temperiert und beidseitig mit 60 W-Strahlern beleuchtet. Um den Versuch zu beginnen, wurde die betreffende Schwefelverbindung zugegeben. Elementarschwefel wurde ohne autoklavieren in fester Form in den Fermenter gegeben, um die Speziation durch das Erhitzen nicht zu verändern.

3.6.2. Kultivierung in Flaschen

Die Wachstumsversuche für die Analyse der Kulturüberstände durch XANES-Spektroskopie und zur Untersuchung des Einflusses von Inhibitoren auf die Schwefelaufnahme wurden in 100 mL Kulturflaschen durchgeführt. Hierfür wurden diese mit Nullmedium und der entsprechenden Schwefelverbindung gefüllt. Handelte es sich bei dieser um Elementarschwefel, wurden die Flaschen mit Hilfe eines Magnetrührstabes im Licht gerührt, bei Wachstum mit Sulfid und Thiosulfat wurden sie bei 30 °C im Lichtbrutschrank inkubiert. Als Vorkultur wurden 25 mL photoorganoheterotroph angezogene Kultur verwendet, die 10 min bei 4000 g zentrifugiert wurden. Das Sediment wurde im Rücklauf resuspendiert und anschließend in die Kulturflaschen gegeben. Nach der Probennahme wurden die Flaschen mit Nullmedium wieder randvoll gefüllt. Der pH-Wert wurde grob mit Hilfe von 1 M HCl und 1 M NaCO₃ auf pH 7 eingestellt.

3.7 Mikroskopische Methoden

Um die erfolgreiche Einkapselung von *Alc. vinosum* durch LbL zu beobachten, wurden die Zellen sowohl im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop als auch im Rasterelektronenmikroskop betrachtet.

3.7.1 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Negativ geladene Zellen wurden mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. 1 mL der eingekapselten Zellen wurde für 10 min mit FITC inkubiert, anschließend wurden die Zellen zehn mal für 5 min bei 2000 g mit dH₂O gewaschen. Die Proben wurden unter einem Leica DMI RE2 konfokalen Laser-Scanning Mikroskop, das mit einem 65 x Ölimmersionsobjektiv ausgestattet war, betrachtet.

3.7.2 Rasterelektronenmikroskopie

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurde 1 mL der eingekapselten Zellen drei Mal bei 2000 g für 5 min mit dH₂O gewaschen. Anschließend wurden 100 µL der Probe an der Luft getrocknet, mit einer 3 nm dicken Iridiumschicht gesputtert und unter einem Hitachi S 4800 FE Rasterelektronenmikroskop betrachtet.

4 Chemisch-analytische Methoden

4.1 Analytische Bestimmung von Schwefelverbindungen

Die Bestimmung der Schwefelverbindungen Sulfid, Thiosulfat, Sulfit, Polysulfide und Sulfat erfolgte über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) nach Rethmeier *et al.*, 1997. Sulfid, Thiosulfat, Sulfit und Polysulfide wurden als Monobromobimanderivate über Reversed-Phase-Chromatographie verbunden mit Fluoreszenzdetektion nachgewiesen, während für Sulfat Ionenchromatographie an einer Anionenaustauschersäule mit anschließender UV-Detektion verwendet wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Gerät der Firma Thermo Separation Products (Egelsbach, Deutschland) verwendet, das sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzt:

Entgaser	SCM1000
Pumpe	P200, P4000
Detektor	Fluoreszenzdetektor FL3000, UV-Detektor UV150
Säulenofen	Column Thermostat Jetstream2

4.1.1 HPLC-Analyse von Monobromobimanderivaten

In einem 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß wurden 50 µL HEPES-Puffer und 55 µL Acetonitril vorgelegt. Zu diesem Ansatz wurden 50 µL Kultur und 5 µL in Acetonitril gelöstes 48 mM Monobromobiman gegeben. Anschließend wurde 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Derivatisierungsreaktion wurde durch Zugabe von 100 µL 65 mM Methansulfonsäure abgestoppt. Bis zur endgültigen Analyse der Proben wurden diese bei -20 °C gelagert.

Vor der Analyse wurden die Proben 10 min bei 16100 g zentrifugiert. Für die eigentliche Analyse wurden 10 µL des Überstandes entnommen und mit 190 µL des Laufmittels A ge-

HEPES-Puffer

1,2 g HEPES
 1,0 mL 0,5 M EDTA pH 8,0
 ad 100 mL rH₂O

gemischt. Aus diesem Gemisch wurden 10 µL auf die Säule injiziert und über Reversed-Phase Chromatographie getrennt.

Laufmittel A

0,25 % (v/v) Essigsäure, mit 10 M NaOH auf pH 4,0 titriert, Filtration durch Membranfilter (Porengröße 0,22 µm)

Laufmittel B

Methanol

Trennsäule

LiChrospher 100 RP18 (125 - 4, 5 µm)

Merck (Darmstadt, Deutschland)

Elutionsprotokoll

lineare Gradienten

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

Flussrate

1,0 mL min⁻¹

Temperatur des Säulenofens

35 °C

Detektion

Fluoreszenzdetektion, Anregung bei 380 nm, Emission bei 480 nm

4.1.2 HPLC-Analyse von Sulfat

Zur Bestimmung von Sulfat wurde 1 mL Kultur 4 min bei 16100 g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Überstände wurden bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Vor der Analyse wurden sie ein weiteres Mal 10 min bei 16100 g zentrifugiert und anschließend 60 µL des Überstandes auf die Säule injiziert.

Laufmittel A

4 mM *p*-Hydroxybenzoesäure

Laufmittel B

Methanol

Trennsäule

PRP-X100

Hamilton (Bonaduz, Schweiz)

Elutionsprotokoll

isokratisch, 97 % Laufmittel A, 3 % Laufmittel B

Flussrate

2 mL min⁻¹

Detektion

UV-Detektion bei 254 nm

4.1.3 Nasschemische Sulfatbestimmung

Auf Grund der hohen Salzkonzentrationen konnte in *Hlr. halophila*-Kulturen Sulfat nicht mittels Ionenchromatographie bestimmt werden. Daher wurde in diesem Fall die turbidometrische Bestimmung von Sulfat nach Sorbö (1987) genutzt. Hierfür wurden 300 µL Kultur bei 16100 g für 4 min zentrifugiert und der Überstand mit 300 µL 0,5 M TCA versetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur offen inkubiert und anschließend ein weiteres Mal bei 16100 g für 1 min zentrifugiert. Ein 100 µL-Aliquot der Probe wurde in eine 96 well-Mikrotiterplatte pipettiert und mit 60 µL 0,25 M TCA versetzt. Nach Zugabe von 40 µL BaCl₂-Reagenz wurde die Platte für 20 min geschüttelt und schließlich die Absorption bei 450 nm bestimmt.

BaCl₂-Reagenz

0,489 g BaCl₂ × 2 H₂O
7,5 g PEG 6000
ad 50 mL dH₂O

Für die Kallibriergerade wurde ein Volumen 10 mM Na₂SO₄ mit einem Volumen 0,5 M TCA versetzt. Von dieser Lösung wurden 160 µL in die 96 well-Mikrotiterplatte gegeben und mit 40 µL BaCl₂-Reagenz versetzt. Die Kallibriergerade wurde im Bereich von 25 - 500 nmol Na₂SO₄ erstellt.

4.1.4 Nasschemische Sulfitbestimmung

Während einiger Wachstumsversuche wurde Sulfit nasschemisch bestimmt, um den Verlauf der Sulfitkonzentrationen während des Experiments besser beurteilen zu können. Die Bestimmung erfolgte colorimetrisch mit der Fuchsinmethode (modifiziert nach Grant, 1947). Für die Analyse wurde 1 mL Kultur für 4 min bei 16100 g zentrifugiert und zwischen 7 und 10 µL des Überstandes in die Analyse eingesetzt. Der Ansatz erfolgte in einem 1,5 mL Safelock-Mikroreaktionsgefäß.

690 µL Probe + dH₂O
200 µL 2 % Zink-Acetat
100 µL Fuchsin-Reagenz
mischen, 10 min inkubieren
10 µL 37 % Formaldehyd
mischen, 10 min inkubieren

Anschließend wurde die Extinktion bei 570 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Kallibriergerade wurde mit Natriumsulfit im Bereich von 0-40 nmol/Ansatz erstellt.

Fuchsin-Reagenz

0,04 % Fuchsin in 10 % H₂SO₄

4.1.5 Bestimmung des intrazellulären Schwefels

Der intrazelluläre Schwefel wurde colorimetrisch bestimmt (modifiziert nach Bartlett und Skoog, 1954). 200 µL einer Kulturprobe wurden in einem Safelock-Mikroreaktionsgefäß für 4 min bei 16100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -20 °C bis zur Analyse gelagert. Vor der Analyse wurde das Pellet in 200 µL dH₂O resuspendiert.

200 µL Sediment indH₂O
100 µL 0,2 M Natriumcyanid
10 min bei 100 °C inkubieren
650 µL dH₂O
50 µL Eisennitrat-Reagenz

Der Ansatz wurde für 2 min bei 16100 g zentrifugiert und bei einer Wellenlänge von 460 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Kallibriergerade wurde mit 0,25 M Natriumrhodanid im Bereich von 0-350 nmol/Ansatz erstellt.

Eisennitrat-Reagenz

30 g Fe(NO₃)₃ x 9 H₂O
40 mL 55 % HNO₃
ad 100 mL dH₂O

4.1.6 Bestimmung der Proteinkonzentration in *Alc. vinosum*-Kulturen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von *Alc. vinosum*-Kulturen erfolgte mit Hilfe von Bradford-Reagenz nach Anleitung des Herstellers. Es wurde 1 mL Kultur für 4 min bei 16100 g zentrifugiert und die Sedimente anschließend bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.

Vor der Analyse wurde das Sediment in 1 mL 1 M NaOH resuspendiert und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 3 min bei 16100 g wurden 25 µL Überstand mit 750 µL Bradford-Reagenz versetzt und 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Analyse wurde in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Kallibriergerade wurde mit 2 mg mL⁻¹ BSA im Bereich von 0-1,4 mg mL⁻¹ erstellt.

4.1.7 Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen

Um die Proteinkonzentrationen der isolierten Proteine der äußeren Membran und der extrahierten extrazellulären, polymeren Substanzen zu bestimmen, wurde das BCA Protein-Assay verwendet. Die Analyse wurde in 96-well-Platten nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden 25 µL Proteinprobe mit 200 µL Arbeitsreagenz gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 550 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Kallibriergerade wurde mit dem mitgelieferten BSA-Standard im Bereich von 0 - 500 µg mL⁻¹ erstellt.

4.1.8 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Lösungen wurden mit rH₂O entsprechend verdünnt und ihre Konzentrationen in einem Küvettenvolumen von 50 µL bestimmt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$c [\mu\text{g mL}^{-1}) = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

OD_{260} = Absorption bei 260 nm
 V = Verdünnungsfaktor
 F = Multiplikationsfaktor: 50 µg mL⁻¹ für dsDNA; 40 µg mL⁻¹ für RNA

Für die Berechnung der Konzentrationen der RNA-Standards für die quantitative real-time RT-PCR wurde ein Richtwert von 333 g mol⁻¹ pro Base verwendet.

Die Reinheit der Präparationen wurde Anhand des Verhältnisses $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ überprüft, welches für proteinfreie Nukleinsäurelösungen zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

4.1.9 Zuckerbestimmung

Um die Zuckerkonzentration nach der Extraktion von extrazellulären, polymeren Substanzen zu bestimmen, wurde die Methode nach Kakii *et al.* (1986) verwendet. Hierfür wurden 333 μL Probe mit 667 μL Anthronlösung versetzt und gemischt. Anschließend wurde der Ansatz für 15 min bei 100 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde die Extinktion bei 620 nm gegen den Reagenzienleerwert bestimmt. Die Kallibriergerade wurde mit einer Glucosestammlösung im Bereich von 10 - 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ erstellt.

Anthronlösung

0,2 g Anthron in 100 mL H_2SO_4

5 Molekularbiologische Methoden

5.1 Amplifikation von DNA und RNA

5.1.1 Standardprotokoll für die PCR

Die PCR erlaubt die Amplifikation großer Mengen DNA-Fragmente mit definierter Länge von bekannten DNA-Sequenzen (Mullis *et al.*, 1986). Eine Standard-PCR wurde mit dem GC-RICH PCR System durchgeführt. Dieses Kit bietet einen Polymerasemix sowie einen passenden Puffer, MgCl_2 und spezielles PCR-Wasser, wobei die Zusammensetzung aller Komponenten besonders auf DNA mit hohem GC-Gehalt ausgerichtet ist. Ein Ansatz umfasste 50 μL und die Reaktion wurde in einem Biometra TRIO-Thermoblock (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Ein typischer PCR-Ansatz und ein Standardprogramm sahen folgendermaßen aus:

Standardansatz

1 μL Primer 1 (100 pmol μL^{-1})
 1 μL Primer 2 (100 pmol μL^{-1})
 1 μL dNTPs (jeweils 10 mM)
 1 μL Template-DNA
 3 μL MgCl_2
 10 μL 5x GC-Rich-Puffer
 1 μL GC-Rich-Enzym-Mix
 32 μL PCR- H_2O

Standardprogramm

Initiale Denaturierung	96 °C	1 min	} 30x
Denaturierung	96 °C	30 s	
Annealing	$T_m - 3$ °C	45 s	
Elongation	72 °C	1 min/ 1kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Lagerung	4 °C	gehalten	

Der Ansatz wurde mit 30 μL Mineralöl überschichtet, um Verdunstungsverluste zu verhindern. Die Schmelztemperatur der Primer wurde nach der Formel $T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T) \text{ }^\circ\text{C}$ berechnet. Die Primersequenzen selbst wurden entweder mit Hilfe von Primer3 oder “von Hand“ festgelegt, wobei dann auf einen ausgeglichenen GC-Gehalt und die Vermeidung von Haarnadelstrukturen geachtet wurde.

5.1.2 Protokoll für die Kolonie-PCR

Bei einer Kolonie-PCR wurde statt isolierter, gereinigter Template-DNA Zellmaterial aus *Alc. vinosum* eingesetzt. Das Material wurde entweder aus Flüssigkultur oder von Phytigelplatten gewonnen. Zur Gewinnung aus Flüssigkultur wurden 500 μL Kultur 5 min bei 9300 *g* zentrifugiert, das Sediment anschließend in 500 μL rH₂O resuspendiert und weitere zwei Mal auf diese Art gewaschen. Im letzten Schritt wurde das Sediment in 20 μL rH₂O resuspendiert. Material von Phytigelplatten wurde in 500 μL rH₂O suspendiert und dann wie oben beschrieben gewaschen. Kolonie-PCRs wurden im Gegensatz zu Standard-PCRs mit *Taq*-Polymerase durchgeführt. Ein typischer Ansatz und ein Standardprogramm sahen folgendermaßen aus:

Standardansatz		Standardprogramm		
1 μL	Primer 1 (100 pmol μL^{-1})	Initiale Denaturierung	96 $^\circ\text{C}$	10 min
1 μL	Primer 2 (100 pmol μL^{-1})	Denaturierung	96 $^\circ\text{C}$	30 s
1 μL	dNTPs (jeweils 10 mM)	Annealing	$T_m - 3 \text{ }^\circ\text{C}$	45 s
2 μL	Zellmaterial	Elongation	72 $^\circ\text{C}$	1 min/ 1kb
10 μL	MgCl ₂	Finale Elongation	72 $^\circ\text{C}$	5 min
10 μL	5x <i>Taq</i> -Puffer (+KCl -MgCl ₂)	Lagerung	4 $^\circ\text{C}$	gehalten
1 μL	<i>Taq</i> -Polymerase			
24 μL	rH ₂ O			

Die Ansätze wurden mit 30 μL Mineralöl überschichtet, um Verdunstungsverluste zu verhindern. Damit die *Taq*-Polymerase durch die lange initiale Denaturierung keinen Schaden nahm, wurde sie erst am Ende der Initialdenaturierung zugegeben.

5.1.3 *in vitro*-Transkription von DNA

Zur Herstellung von RNA-Standards wurden gereinigte PCR-Amplifikate mit Hilfe von T7-RNA-Polymerase in RNA umgeschrieben. Hierfür wurde das Riboprobe System T7-Kit

entsprechend den Empfehlungen des Herstellers genutzt. Ein Ansatz für die *in vitro*-Transkription sah folgendermaßen aus:

20 µL	transkriptionsoptimierter 5x Puffer
10 µL	100 mM DTT
2,5 µL	Rekombinanter RNasin Ribonuklease Inhibitor
20 µL	rNTPs
10 µL	PCR-Produkt der Standards
2 µL	T7 RNA-Polymerase
35,5 µL	nukleasefreies H ₂ O
2 h bei 37 °C inkubieren	
2 µL	RQ1 RNasefrei DNase
15 min bei 37 °C inkubieren	

Die Transkriptionskontrolle wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.1.4 Quantitative real-time RT-PCR

Zur Quantifizierung der Kopienzahlen verschiedener Gene wurde das QIAGEN RT-PCR Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei wird mRNA in cDNA umgeschrieben und diese anschließend wie bei einer herkömmlichen PCR mit Hilfe entsprechender Primer amplifiziert. Die Quantifizierung erfolgte durch SYBR-Green, einem Fluoreszenzfarbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Ein typischer Ansatz umfasste 25 µL und sah folgendermaßen aus:

Standardansatz		Standardprogramm		
12,5 µL	2x QuantiTect SYBR Green	Reverse Transkription	50 °C	30 min
1 µL	Primer 1 (100 pmol µL ⁻¹)	Initiale Inaktivierung	95 °C	15 min
1 µL	Primer 2 (100 pmol µL ⁻¹)	Denaturierung	94 °C	15 s
0,25 µL	QuantiTect RT-Mix	Annealing	T _{opt}	30 s
x µL	Template-RNA	Extension	72 °C	30 s
10,25 - x µL	nukleasefreies H ₂ O	Schmelzkurvenanalyse	40 - 100 °C	
		Lagerung	4 °C	gehalten

Das eingesetzte Volumen an Template-RNA richtete sich danach, ob der Ansatz zur Quantifizierung der Standards oder der mRNA dienen sollte. Für die Standards wurden Konzentrationen von 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰ und 10¹¹ Molekülen µL⁻¹ verwendet und jeweils 1µL als Template eingesetzt. Für die Quantifizierung der mRNAs wurden 250 ng isolierte RNA verwendet. Es wurden jeweils die Ansätze für eine vollständige Standardkurve und die zu untersuchenden isolierten RNAs für ein Gen zusammen in einer 96 well-Platte

angesetzt und dann entsprechend dem Standardprogramm im iCycler (Biorad, München) quantifiziert, wobei die Detektion des Fluoreszenzsignals jeweils am Ende des Extensionschrittes erfolgte. Nach dem Lauf wurde das Ergebnis mit der iQ Optical System Software Version 3.1 ausgewertet.

5.2 DNA-Transfer

5.2.1 Transformation kompetenter Zellen

Für eine Transformation wurden 100 μL kompetente *E. coli*-Zellen mit 1 μL Plasmidlösung versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 90 s einem Hitzeimpuls von 42 °C ausgesetzt und 2 min auf Eis wieder gekühlt. Nach Zugabe von 500 μL 2 x YT-Medium wurden *E. coli* DH5 α -Zellen für 1 h und *E. coli* S17-1-Zellen für 3 h bei 37 °C inkubiert. 100 μL des Transformationsansatzes wurde auf geeignetem Selektionsmedium ausplattiert. Der restliche Transformationsansatz wurde für 4 min bei 10000 g zentrifugiert, das Sediment im Rücklauf resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Beide Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Zugabe von DNA ebenfalls transformiert und auf dem Selektionsmedium ausplattiert.

5.2.2 DNA-Transfer von *E.coli* nach *Alc. vinosum*

Der Transfer von Plasmid-DNA in *Alc. vinosum* erfolgte durch Konjugation (Pattaragulwanit & Dahl, 1995) mit *E. coli* S17-1 als Donorstamm. *E. coli* S17-1 wurde auf einer LB-Platte, die Antibiotika entsprechend der Resistenzen der verwendeten Plasmide enthielt, ausgestrichen und bei 37 °C etwa 16 h inkubiert, so dass sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Von der Platte wurden *E. coli* Zellen bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5 bis 0,8 in RCV-Medium suspendiert. Bei *E. coli* entspricht eine OD_{600} von 0,1 etwa 1×10^8 Zellen mL^{-1} (Sambrook *et al.*, 1989). Anhand dieser Angabe wurde die Zellzahl in 500 μL Kultur bestimmt. *Alc. vinosum* wurde in RCV-Medium etwa vier Tage angezogen, was einer OD_{690} von 1,3-1,6 entspricht. Die Zellen befanden sich in der stationären Wachstumsphase. Für den gemessenen OD-Wert wurde die Zellzahl von *Alc. vinosum* ermittelt (nach Pattaragulwanit, 1994). Da Donor und Rezipient in einem Verhältnis von 1:3 vorliegen sollen, wurde ein Volumen *Alc. vinosum*-Kultur, das der dreifachen Anzahl an Zellen in 500 μL *E. coli*-Kultur entsprach, in einem Mikroreaktionsgefäß 5 min bei 9300 g

zentrifugiert. Das Sediment wurde durch wiederholtes Resuspendieren und Abzentrifugieren zweimal in 500 µL RCV-Medium gewaschen. Anschließend wurden zu den *Alc. vinosum* Zellen 500 µL *E. coli*-Suspension gegeben. Dieses Gemisch wurde 5 min bei 9300 g zentrifugiert und das Sediment im Rücklauf resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf einen sterilen Nitrocellulose-Filter (Porengröße 0,45 µm), der sich auf einer RCV-Agarplatte befand, pipettiert. Die Platten wurden 2 Tage bei 30 °C anoxisch im Licht bebrütet. Anschließend wurde der bewachsene Filter von der Platte genommen und in ein steriles Mikroreaktionsgefäß gegeben, in dem die Zellen mit 1 mL RCV-Medium vom Filter gespült wurden. Zur Selektion positiver *Alc. vinosum*-Klone wurde die Zellsuspension auf Phytigelplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und für mindestens 7 Tage bei 30 °C anoxisch im Licht inkubiert.

5.2.3 Selektion positiver Klone

Die Selektion positiver Klone erfolgte sowohl nach der Transformation von *E. coli* als auch nach der Konjugation von *Alc. vinosum* ausschließlich auf die jeweiligen Antibiotikaresistenzen der verwendeten Plasmide.

5.3 Enzymatische Modifikation von DNA

5.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsansätze enthielten folgende Komponenten:

0,5 bis 10 ng	DNA
$\frac{1}{10}$ des Gesamtvolumens	10× Inkubationspuffer
3 - 5 U (µg DNA) ⁻¹	Restriktionsenzym
ad Endvolumen	rH ₂ O

Die Restriktionsansätze wurden 3 h bei einer Temperatur, bei der das Enzym optimale Aktivität zeigte, inkubiert.

5.3.2 Manipulation von DNA-Einzelstrangenden

Mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli* können überhängende 5'-Enden von Restriktionsfragmenten aufgefüllt werden (Cobianchi und Wilson, 1987). Die

Klenow-DNA-Polymerase konnte den Restriktionsansätzen nach der Inkubation und anschließender Hitzeinaktivierung direkt zugegeben werden. Einem 200 µL Restriktionsansatz mit 0,5 -10 ng DNA wurden 4 µL dNTPs (je 10 mM) und 4 U Klenow-Polymerase zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mittels QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und in 30 µL rH₂O eluiert.

5.3.3 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Um linearisierte Vektormoleküle durch alkalische Phosphatase am 5'-Ende zu dephosphorylieren, wurde folgender Ansatz verwendet:

30 µL	DNA-Lösung
5 µL	10× CIAP-Puffer
2,5 U	CIAP
ad 50 µL	rH ₂ O

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und in 30 µL rH₂O eluiert.

5.3.4 Ligation von DNA

Ein Ligationsansatz war wie folgt zusammengesetzt:

≈ 100 ng	Vektor-DNA
im molaren Verhältnis Vektor:Insert 1:7	Insert-DNA
2 µL	10× T4-Ligase-Puffer
2 - 3 U	T4-DNA-Ligase
ad 20 µL	rH ₂ O

Die Ligationsansätze wurden bei 8 °C über Nacht im Kühlschrank inkubiert und anschließend sofort 10 µL des Ansatzes zur Transformation eingesetzt.

5.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA

5.4.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gele mit einem Anteil von 1 - 2 % Agarose verwendet. Die

Agarose wurde in 1x TAE-Elektrophoresepuffer durch Aufkochen gelöst und in den Gelträger gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde es mit 1x TAE-Elektrophoresepuffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit $\frac{1}{10}$ Volumen 10x Probenauftragspuffer versetzt. Neben den Proben wurde als DNA-Größenstandard 1 kb- bzw. 100 bp-Leiter aufgetragen.

50x TAE-Elektrophoresepuffer

2 M Tris
1 M Essigsäure
50 mM EDTA

10x Probenauftragspuffer

0,25 % (w/v) Bromphenolblau
40 % (w/v) Saccharose

Es wurden horizontale Elektrophoresekammern (Horizon® 11·14, Gibco BRL, München, Deutschland) verwendet, an die Spannungen von 100 V angelegt wurden, so dass sich eine Laufzeit von etwa 1 h ergab.

Die Agarosegele wurden zur Färbung für 5 bis 10 Minuten in Ethidiumbromid ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) leicht geschüttelt und anschließend für weitere 5 bis 10 Minuten in dH_2O inkubiert. Ausgewertet wurden die gefärbten Gele auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 312 nm, wobei die Ergebnisse mit einem Videosystem der Firma INTAS aufgezeichnet wurden.

5.4.2 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Für die elektrophoretische Auftrennung von RNA wurden Gele verwendet, die sowohl Agarose als auch Formaldehyd enthielten. Zur Herstellung aller notwendigen Puffer wurde DEPC-behandeltes dH_2O verwendet, zudem wurde der 5x RNA-Elektrophoresepuffer nach der Herstellung zweimal autoklaviert. Vor dem Auftragen wurden $3 \mu\text{L}$ RNA-Probe mit $6 \mu\text{L}$ RNA-Probenpuffer versetzt und bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min inkubiert. Anschließend wurden $2 \mu\text{L}$ RNA-Gelpuffer zugegeben und die Proben dann auf das Agarosegel aufgetragen. Dieses war zuvor mit 1x RNA-Elektrophoresepuffer überschichtet und bei einer Spannung von 60 V 20 min vorinkubiert worden.

RNA-Agarosegel

1 % Agarose
6,5 % Formaldehyd
in 1x RNA-Elektrophoresepuffer

5x RNA-Elektrophoresepuffer

200 mM MOPS
50 mM Natriumacetat
5 mM EDTA
in DEPC- dH_2O
pH 7,0

RNA-Probenpuffer

10 mL deionisiertes Formamid
3,5 mL 37 % Formaldehyd
2 mL 5× RNA-Elektrophoresepuffer

RNA-Gelpuffer

50 % Glycerin
1 mM EDTA
0,4 % Bromphenolblau
in DEPC-dH₂O

DEPC-H₂O

0,1 % (v/v) DEPC in dH₂O
24 h unter Rühren inkubieren, anschließend
zweimal autoklavieren

5.5 Reinigung von DNA und RNA

5.5.1 Reinigung von DNA

Nach PCR-Reaktionen oder Restriktionsverdauen wurden die Ansätze mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits gereinigt. Die zu reinigenden Ansätze wurden den Angaben des Herstellers entsprechend behandelt und die DNA abschließend mit 30 µL rH₂O eluiert.

5.5.2 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Alternativ wurden PCR-Produkte und Restriktionsverdauungen auch mittels des QIAquick Gel Extraction Kits gereinigt. Auch hier wurden die zu reinigenden Ansätze den Angaben des Herstellers entsprechend behandelt und abschließend die DNA mit 30 µL rH₂O isoliert.

5.5.3 Reinigung von RNA

RNA-Präparationen wurden mit Hilfe des RNeasy Mini Kits und des RNase-Free DNase Sets gereinigt. Das RNeasy Mini Kit wurde nach der Anleitung des Herstellers benutzt, wobei während der Durchführung nach Bedarf auf der Säule mehrmals hintereinander mit DNase I - ebenfalls nach Angaben des Herstellers - verdaut wurde.

5.6 Methoden zur Präparation von DNA und RNA

5.6.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *Alc. vinosum*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *Alc. vinosum* wurde auf der Grundlage der Sarkosyl-

Lyse (modifiziert nach Bazaral & Helsinki, 1968) und anschließender Reinigung durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Dialyse durchgeführt.

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA

TES-Puffer

50 mM Tris-HCl pH 8,0
0,5 mM EDTA
50 mM NaCl

Saccharose-TES-Puffer

20 % Saccharose (w/ v) in TES-Puffer

Lysozym-RNase-Lösung

20 mg mL⁻¹ Lysozym
1 mg mL⁻¹ RNase

Sarcosin-Lösung

10 % (w/ v) N-Laurylsarcosin
250 mM EDTA

Es wurden 25 mL *Alc. vinosum* Kultur für 10 min bei 2500 g zentrifugiert und das Sediment in 1 mL 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 resuspendiert, für 5 min bei 16100 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpaste wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Etwa 100 mg der Zellpaste wurden in einem 2 mL Mikroreaktionsgefäß in 1 mL eiskalten TES-Puffer resuspendiert und anschließend mit 1 weiteren mL TES-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 16100 g bei 4 °C zentrifugiert und das Sediment dann in 250 µL Saccharose-TES-Puffer resuspendiert und 30 min auf Eis gestellt. Hierauf folgte die Zugabe von 250 µL Lysozym-RNase-Lösung, wobei zur vollständigen Zelllyse für 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert wurde. Nach Zugabe von 100 µL Sarcosin-Lösung wurde der Ansatz geschwenkt, wobei die chromosomale DNA als viskose Masse sichtbar wurde. Die DNA wurde durch zehnmaliges Aufsaugen und wieder Herausdrücken durch eine sterile Kanüle in eine sterile Spritze geschert, anschließend wurden 300 µL rH₂O zugegeben. Eine viermalige Extraktion mit Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) und eine einmalige Extraktion mit Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) folgten. Bei allen Extraktionsschritten wurden die DNA-Proben mit einem Volumen des Extraktionsmittels versetzt und stark geschüttelt. Zur Beschleunigung der Phasentrennung wurde anschließend 5 min bei 16100 g zentrifugiert und schließlich die obere DNA-haltige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur weiteren Reinigung wurde die DNA-Lösung in vorbereitete Dialyseschläuche (MWCO 6000-8000) gegeben und diese mit Klammern verschlossen. Es wurde zunächst 3 h gegen TE-Puffer, pH 8,0, dann über Nacht nochmals gegen TE-Puffer, pH 8,0 und schließlich 2 h gegen rH₂O dialysiert. Der Schlauchinhalt wurde in sterile Mikroreaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert.

5.6.2 Isolierung von RNA aus *Alc. vinosum*

Zur Isolierung von RNA wurde die für gramnegative Bakterien beschriebene Methode aus Ausubel *et al.* (1990-1999) verwendet. Hierfür wurden 10 mL Kultur bei 4000 g für 10 min zentrifugiert und das Sediment anschließend in 10 mL kaltem Protoplastenpuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 80 µL Lysozymbilösung wurde der Ansatz 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 2000 g für 5 min erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde in 500 µL Lysispuffer resuspendiert und 15 µL DEPC zugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, in ein steriles 2 mL Mikroreaktionsgefäß überführt, bei 37 °C 5 min inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 250 µL NaCl-Lösung und mehrmaligem Invertieren wurde der Ansatz wieder 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 16100 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in zwei sterile 2 mL-Reaktionsgefäße überführt, zu denen jeweils 1 mL Ethanol gegeben wurde. Anschließend wurden die Ansätze 12 h bei -20 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie bei 16100 g für 15 min zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Sedimente an der Luft getrocknet. Die trockenen Sedimente wurden dann in je 50 µL DEPC-rH₂O resuspendiert, vereinigt und nach Anleitung des Herstellers mit dem RNeasy Mini Kit gereinigt. Dabei wurde auf der Säule dreimal mit DNase1 - ebenfalls nach Angaben des Herstellers - verdaut. Nach der Elution wurde zu dem gereinigten Ansatz 1 U µL⁻¹ RNasin Ribonuklease Inhibitor gegeben. Dann wurde er bei -70 °C gelagert.

Protoplastenpuffer

15 mM Tris-HCl, pH 8,0
0,45 M Saccharose
8 mM EDTA
10 min autoklaviert, Lagerung bei 4 °C

Lysozymbilösung

50 mg mL⁻¹ Lysozym in rH₂O

NaCl-Lösung

40 g NaCl in 100 mL rH₂O rühren bis zur Sättigung, DEPC zugeben und autoklavieren

Lysispuffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM NaCl
1 mM Natriumcitrat
1,5 % SDS

5.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli*-Stämmen erfolgte mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit. Zur Plasmidisolierung wurden 10 mL LB-Medium, dem die

entsprechenden Antibiotika zugegeben waren, mit *E. coli* beimpft und 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Zellmaterial nach Angaben des Herstellers behandelt, die Plasmid-DNA mit 30 µL rH₂O von der Säule eluiert und bei -20 °C gelagert.

6 Biochemische Methoden

6.1 Reinigung und Isolierung von Proteinen

6.1.1 Präparation von periplasmatischen Proteinen aus *Alc. vinosum*

Für die Reinigung von periplasmatischen Proteinen mit Strep-Tag wurden photoorganoheterotroph und photolithoautotroph gezogenen Kulturen verwendet. Zur Präparation periplasmatischer Proteine wurden 100 mL Kultur bei 4000 g für 10 min zentrifugiert und in 1 mL eiskalten Puffer P resuspendiert. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, anschließend bei 16000 g 5 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Sollten Proteine mit dem Protein, das mit einem Strep-Tag versehen war, verlinkt werden, wurden vor dem Beginn der Präparation 0,6 % 37 %iges Formaldehyd zu der Kultur gegeben und die Kultur für weitere 20 min bei 30 °C im Licht inkubiert.

Puffer P

100 mM Tris-HCl, pH 8,0
500 mM Saccharose
1 mM EDTA

6.1.2 Präparation von cytoplasmatischen Proteinen aus *Alc. vinosum*

Für die Präparation von cytoplasmatischen Proteinen wurden 100 mL *Alc. vinosum*-Kultur bei 4000 g für 10 min zentrifugiert und das Sediment für Strep-Tag-Reinigungen in 6 mL kaltem Puffer W oder für die Isolierung von Proteinen der äußeren Membran in Tris-HCl, pH 8,0 (nach Hindennach & Henning, 1975) oder TrisA (nach Shen *et al.*, 1989) (Zusammensetzungen der Puffer siehe jeweils dort) resuspendiert. Anschließend wurden die Proben für 12 min im Ultraschall (Cell Disruptor B15, Branson, Danbury, USA) aufgeschlossen und bei 27000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

6.1.3 Reinigung von Proteinen mit Strep-Tag aus *Alc. vinosum*

Für die Reinigung von Proteinen mit Strep-Tag aus *Alc. vinosum* wurden Strep-Tactin-Säulen mit einem Säulenbettvolumen von 1 mL verwendet. Diese wurden mit zwei Säulenvolumen des Puffers W equilibriert. Die klaren Lysate aus den Abschnitten 6.1.1 oder 6.1.2 wurden vor dem Auftragen bei 16100 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule fünf Mal mit einem Säulenvolumen Puffer W gewaschen. Die Elution erfolgte mit sechs Mal einem halben Säulenvolumen Puffer E, wobei das Eluat in Fraktionen von einem halben Säulenvolumen gesammelt wurde.

Puffer W		Puffer E	
100 mM	Tris-HCl, pH 8,0	100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
150 mM	NaCl	150 mM	NaCl
1 mM	EDTA	1 mM	EDTA
0,1 % (v/v)	Tween	0,1 %	Tween
pH 8,0		2,5 mM	Desthiobiotin
		pH 8,0	

6.1.4 Isolierung von Proteinen der äußeren Membran nach Hindennach & Henning (1975)

Für die Isolierung von Proteinen der äußeren Membran aus *Alc. vinosum* wurden Lysate verwendet, die wie in Abschnitt 6.1.2 beschrieben, gewonnen wurden. Diese wurden bei 22000 g für 60 min zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend in 10 mL 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 resuspendiert und mit 1,5 % (w/v) N-Laurylsarcosin versetzt. Nachdem dieses durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vollständig gelöst war, wurde der Ansatz bei Raumtemperatur 20 min inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 22000 g für 90 min. Anschließend wurde das Sediment in 100 µL Tris-HCl, pH 8,0 resuspendiert und entweder sofort in eine SDS-PAGE eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

6.1.5 Isolierung von Proteinen der äußeren Membran nach Shen *et al.* (1989)

Auch für die Isolierung der Proteine der äußeren Membran von *Alc. vinosum* nach dieser Methode wurden Lysate verwendet, die wie in Abschnitt 6.1.2 beschrieben, gewonnen wurden. Diese wurden bei 145000 g für 60 min zentrifugiert. Das Sediment wurde dann in 2 mL TrisA resuspendiert, mit 0,5 % Nonidet P40 versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 137000 g für 60 min.

Das Sediment wurde in 2 mL TrisA resuspendiert und für 24 h gegen 10 mM Tris-HCl, pH 7,8 dialysiert, wobei der Puffer zweimal gewechselt wurde. Die Proteinlösungen wurden entweder sofort in eine SDS-PAGE eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

TrisA

- 50 mM Tris-HCl, pH 7,8
- 4 mM MgCl₂ × 7 H₂O
- 4 mM CaCl₂ × 2 H₂O

6.2 Elektrophoretische Proteintrennung

6.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Elektrophorese von Proteinen wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele, die aus einem Sammelgel zur Fokussierung der Proben und einem Trenngel zur eigentlichen Auftrennung bestanden, genutzt. Es wurden Gele mit einem 15 %igen Acrylamid/Bisacrylamid-Anteil verwendet. Die angegebenen Mengen reichten für zwei Gele von 0,75 bis 1 mm Dicke einer Mini Protean II-Kammer (Biorad, München, Deutschland).

Sammelgel

- 3 mL dH₂O
- 1,25 mL Lösung B
- 0,75 mL 30 % Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung
- 100 µL APS
- 5 µL TEMED

Trenngel

- 3 mL dH₂O
- 3 mL Lösung A
- 6 mL 30 % Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung
- 100 µL APS
- 5 µL TEMED

Lösung A

- 0,5 M Tris-HCl, pH 8,8
- 0,3 % SDS

Lösung B

- 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- 0,4 % SDS

5× Elektrophoresepuffer

- 15 g Tris
- 72 g Glycin
- 5 g SDS
- ad 1 L dH₂O

Zur Herstellung der Gele wurden die oben aufgeführten Komponenten in der angegebenen Reihenfolge gemischt und die Polymerisation durch die Zugabe von APS und TEMED gestartet. Sowohl das Trenn- als auch das Sammelgel benötigten etwa 60 min um vollständig zu polymerisieren. Die aufzutragenden Proteinproben wurden mit dem 0,25fachen Volumen

des 4× Probenpuffers Rotiload 1 gemischt und bei 95 °C für 5 min inkubiert. Nachdem sie auf Eis wieder abgekühlt waren, wurden sie auf das Sammelgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 1× Elektrophoresepuffer bei 60 - 100 V durchgeführt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ebenfalls ein PageRuler Prestained Protein Ladder aufgetragen.

6.2.2 Coomassie-Färbung

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel in Coomassie-Färbelösung 1 h gefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung durch Entfärberlösung ersetzt. Diese wurde mehrmals erneuert bis die Proteinbanden klar sichtbar wurden. Das Gel wurde anschließend konserviert, indem es in einem Vakuumtrockner (Aldo-Xer gel dryer, Schütt, Göttingen, Deutschland) behandelt wurde.

Coomassie-Färbelösung

0,25 % (v/ v)	Coomassie Blue R250
50 % (v/ v)	Methanol
10 % (v/ v)	Essigsäure
40 % (v/ v)	dH ₂ O

Entfärberlösung

10 %	Essigsäure
20 %	Methanol
70 %	dH ₂ O

6.2.3 Silberfärbung

Zur Durchführung einer Silberfärbung wurde nach der Elektrophorese das Sammelgel entfernt und das Trenngel anschließend 20 min in Entfärberlösung gelegt. Es folgte eine 10 minütige Inkubation in 50 % (v/ v) Methanol. Daran schloss sich eine weitere 10 minütige Inkubation in rH₂O an. Danach wurde das Gel 1 min in 0,02 % (w/ v) Thiosulfat gelegt und anschließend zweimal je 1 min in rH₂O gewaschen. Im nächsten Schritt wurde es bei 4 °C 20 min in 0,1 % (w/ v) Silbernitrat gegeben. Um die Banden sichtbar zu machen, wurde das Gel in eine Lösung aus 3 % (w/ v) Na₂CO₃ und 0,1 % (v/ v) 37%iges Formaldehyd transferiert. Waren die Banden ausreichend gefärbt, wurden 5 % (v/ v) Essigsäure zugegeben, um die Färbung abzustoppen. Abschließend wurde das Gel ein weiteres Mal mit rH₂O gewaschen und dann ebenfalls im Vakuum getrocknet.

6.3 Bestimmung der spezifischen β -Galactosidase-Aktivität

Die Mutanten Tl-*soxB*, Tl-*soxX* und Tl-*soxY* wurden in 12 mL Nullmedium mit den jeweiligen Elektronendonoren für 24 h kultiviert, wobei zum Beimpfen des Mediums 12 mL

photoorganoheterotroph auf RCV-Medium angezogene Kultur verwendet wurden. Diese wurden vor dem Beimpfen bei 4000 g 10 min zentrifugiert und in einem minimalen Rücklaufvolumen resuspendiert. Für das β -Galactosidaseassay nach Grimm *et al.* (2009) wurde 1 mL Kultur bei 13000 g für 3 min bei 4 °C zentrifugiert und das Sediment in 1 mL Z-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 100 μ L Chloroform und 50 μ L 0,1 % (w/ v) SDS zugegeben und die Probe für 10 s bei maximaler Geschwindigkeit gevortext. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei 30 °C wurden 200 μ L vorgewärmte ONPG-Lösung zugegeben. Sobald eine Geldfärbung der Probe sichtbar wurde, wurde die Reaktion durch die Zugabe von 500 μ L 1 M Na_2CO_3 abgestoppt. Nachdem die Probe bei 16100 g 5 min zentrifugiert worden war, wurde die Absorption des Überstandes bei 420 nm gegen den Reagenzienleerwert ge-

Z-Puffer

0,06 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
 0,04 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 0,01 M KCl
 0,001 M MgSO_4
 0,05 M β -Mercaptoethanol
 pH 7,0

ONPG-Lösung

4 mg mL^{-1} in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0

Phosphatpuffer

0,06 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
 0,04 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 pH 7,0

messen. Die spezifische β -Galactosidaseaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität [nmol } o\text{-Nitrophenol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}] = (A_{420} k^{-1}) (V_{\text{Assay}} [\text{mL}])$$

$$(\text{t}_{\text{Assay}} [\text{min}] \text{c}_{\text{Protein}} [\text{mg mL}^{-1}] V_{\text{Kultur}} [\text{mL}])^{-1}$$

A_{420} = Absorption bei 420 nm

V_{Assay} = Volumen des Assays

t_{Assay} = Zeit bis zur Gelbfärbung

c_{Protein} = Proteinkonzentration

V_{Kultur} = Kulturvolumen

$k = 0,0044$

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der in Abschnitt 4.1.6 beschriebenen Methode bestimmt.

7 Physikalische Methoden

7.1 XANES-Spektroskopie an der Schwefel-K-Kante

Mit Hilfe von XANES-Spektroskopie ist es möglich, verschiedene Elementarschwefelspeziationen zu bestimmen (siehe beispielsweise: Prange & Modrow, 2002; Prange *et al.*, 2006).

7.1.1 Experimenteller Aufbau

Die XANES-Spektren wurden an der “Double Crystal Monochromator (DCM) Beamline” des Center for Advanced Microstructures and Devices (CAMD), Baton Rouge, LA, USA aufgenommen (Hormes *et al.*, 2006). Der Speicherring des CAMDs wurde bei einer Energie von 1,3 eV mit Elektronenströmen zwischen 200 und 80 mA betrieben. Die Synchrotronstrahlung wurde durch einen modifizierten Lemonnier-Monochromator (Lemonnier *et al.*, 1978), der mit InSb (111)-Kristallen bestückt war, monochromatisiert. Die monochromatische Teilchenflussdichte pro Sekunde an der Probe betrug bei 200 mA etwa 5610 Photonen. Alle Messungen wurden zweimal wiederholt. Es wurden zwei verschiedene Messmodi verwendet: Transmissionsmodus und Fluoreszenzmodus. Im Transmissionsmodus wird die Absorption der monochromatisierten Strahlung durch die Probe bestimmt, während im Fluoreszenzmodus die durch die Bestrahlung emittierten Photonen detektiert werden (Prange & Modrow, 2002). Messungen im Transmissionsmodus wurden mit Ionisationskammern unter 60 mbar Luftdruck durchgeführt. Für Messungen im Fluoreszenzmodus wurde ein Vortex silicon drift fluorescence detector (SII Nanotechnology, Chiba-shi Chiba, Japan) genutzt, wobei das gesamte Experiment im Falle von Messungen unter anoxischen Bedingungen mit Helium gefüllt war (Mit Experiment ist hier der experimentelle Aufbau am Strahlrohr inklusive Monochromator gemeint, siehe Prange & Modrow, 2002). Zur Energiekalibrierung wurde das Spektrum von Zinksulfat als “zweiter Standard” genutzt, wobei das Maximum der ersten Resonanz, die sogenannte “white line” auf eine Energie von 2481,44 eV gesetzt wurde. Die Reproduzierbarkeit betrug $\pm 0,1$ eV. Die Spektren wurden zwischen 2440 und 2468 eV mit einer Schrittweite von 0,5 eV, zwischen 2468 und 2485 eV mit 0,1 eV und zwischen 2485 und 2520 eV von 0,3 eV Schrittweite gescannt. Die Integrationszeit betrug 1 s. Der lineare Hintergrund, der in der Region vor der Kante aufgenommen wurde, wurde mit Hilfe des Programms Origin (Origin Lab, Northampton,

USA) von den Rohdaten abgezogen und die Spektren ebenfalls mit Hilfe von Origin bei 2510 eV normalisiert. Die Bearbeitung der Spektren mit Origin wurde freundlicherweise von Dr. Henning Lichtenberg durchgeführt.

7.1.2 Quantitative Analyse von XANES-Spektren

Für die quantitative Analyse der XANES-Spektren wurde das Fit- und Plotsoftwarepaket WinXAS (Ressler, 1998) genutzt. Für das Fitten der Spektren wurden in dieser Arbeit insgesamt zehn verschiedene Referenzsubstanzen verwendet. Es handelte sich dabei um Polymerschwefel, *cyclo*-Oktaschwefel, oxidiertes Glutathion, reduziertes Glutathion, Methionin, Natriumthiosulfat, Natriumsulfit, Methioninsulfon, Cysteinsäure und Zinksulfat. Reiner Polymerschwefel und reiner *cyclo*-Oktaschwefel wurden freundlicherweise von Prof. R. Steudel zur Verfügung gestellt. Es wurde ein χ^2 -Kriterium genutzt, um die lineare Kombination dieser Spektren zu finden, die das gemessene XANES-Spektrum mit der größten Wahrscheinlichkeit reproduziert. Der Fehler der relativen prozentualen Beiträge der Schwefelspezies zu den Spektren kann mit ± 10 % angegeben werden. Die quantitative Analyse aller XANES-Spektren wurde von Dr. Henning Lichtenberg durchgeführt.

7.1.3 Probenpräparation

Die analysierten Schwefelplättchen wurden durch Zentrifugation bei 800 g für 10 min von der Kultur getrennt und als dünne, homogene Schicht auf einen schwefelfreien, selbstklebenden Kaptonfilm Typ 7010 aufgebracht und mit einem Polypropylenfilm überzogen. Für die Messung von Bakterienzellen wurden 100 mL Kultur bei 3500 g für 5 min zentrifugiert, das Sediment in 1,5 mL 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 resuspendiert und erneut zentrifugiert (2500 g für 3 min). Zur eigentlichen Messung wurde das Zellpellet auf schwefelfreies Filterpapier pipettiert. Für die Messung von Überständen wurden 2 mL Kultur bei 9000 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und auf ein schwefelfreies Filterpapier pipettiert. Dieses wurde direkt gemessen. Für die Messungen von Kulturüberständen unter anoxischen Bedingungen wurden die Proben wie unter oxischen Bedingungen präpariert, allerdings wurden alle Arbeiten unter einem Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, USA) durchgeführt.

8 Sonstige Methoden

8.1 Layer-by-Layer Nanoeinkapselung

LbL wurde in den letzten Jahren für ein breites Anwendungsgebiet genutzt (Ai *et al.*, 2002). Durch die selbständige Anlagerung gegensätzlich gelagerter Polyionen können Filme, in denen die Komponenten präzise lokalisiert sind, auf geladenen Templates aufgebaut werden (Decher & Hong, 1991; Decher 1997; Lvov *et al.*, 1993; Tsukruk, 1997; Mendelson *et al.*, 2000). Zahlreiche anorganische und organische Templates wie Latex, Fettmikrotubuli, Blutplättchen, Erythrocyten, Stammzellen und mikrobiologische Materialien wie Bakterien können für die Anlagerung von Polyionkapseln genutzt werden (Sukhorukov *et al.*, 1998; Donath *et al.*, 1998; Leporatti *et al.*, 2000; Donath *et al.*, 2002; Diaspro *et al.*, 2002; Lvov *et al.*, 2000; Veerabadran *et al.*, 2007).

8.1.1 Einkapselung von Bakterien

Für die Einkapselung wurden 50 mL photoorganoheterotroph angezogene *Alc. vinosum*-Kultur bei 2000 g für 5 min zentrifugiert und einmal mit dH₂O gewaschen. Das Sediment wurde in einer Lösung mit positiv geladenem Polymer resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Polymerlösung durch zweimaliges Waschen mit dH₂O entfernt und das Sediment dann 10 min in einer Lösung mit negativ geladenem Polymer inkubiert. Die Polymerlösung wurde wieder durch zweimaliges Waschen mit dH₂O entfernt. Die Anlagerung der Polymere wurde wie beschrieben wiederholt, bis die gewünschte Anzahl an Schichten erreicht war.

8.1.2 Bestimmung des ζ -Potentials

Vor dem ersten Einkapselungsschritt und nach jedem weiteren Schritt wurde das ζ -Potential der Zellen bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 20 μ L Zellen mit 2 mL dH₂O in einer Messzelle gemischt und anschließend das ζ -Potential mit einem Zeta Plus Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Cooperation, Holtsville, USA) bestimmt. Die in dieser Arbeit gezeigten ζ -Potentiale sind Mittelwerte aus sieben Messungen.

8.1.3 Polyelektrolyte für die Einkapselung von Bakterien

Für die Einkapselung von *Alc. vinosum*-Zellen wurden verschiedene Kombinationen anionischer und kationischer Polyelektrolyte verwendet. Es handelte sich um die anionischen Polymere Natriumpoly(styrenesulfonat) (PSS, MW ~70000), Poly(acrylsäure) (PAA, MW 5000), Poly(glutaminsäure) (PGA, MW ~40000) und die kationischen Polymere Poly(allylamin)hydrochlorid (PAH, MW ~70000) und Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) (PDDA, MW ~70000). Für den Einkapselungsprozess wurde jedes Polymer in einer Konzentration von 2 mg mL⁻¹ in dH₂O gelöst und die Lösung auf pH 7,0 eingestellt.

8.2 Extraktion von extrazellulären, polymeren Substanzen

Zur Extraktion von extrazellulären, polymeren Substanzen (EPS) wurden jeweils photoorganoheterotroph mit Malat und photolithoautotroph mit Elementarschwefel gezogene Kulturen verwendet, aus denen mit unterschiedlichen Methoden EPS extrahiert wurden.

8.2.1 Chemische Methoden

EPS wurden in verschiedenen Ansätzen durch chemische Methoden isoliert. Hierfür wurden 100 mL Kultur bei 4000 g für 10 min zentrifugiert, das Sediment in 10 mL 0,9 % NaCl resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 10 mL rH₂O resuspendiert und zu der Zellsuspension das Reagenz gegeben, das zur Extraktion verwendet werden sollte. Es wurden Ansätze mit folgenden Reagenzien in den angegebenen Konzentrationen gemacht: 2 mL 9 N NaOH, 4 mL 8% H₂SO₄, 1 g EDTA pro g Zellmasse, 2 g EDTA pro g Zellmasse, 3 g EDTA pro g Zellmasse und 4 g EDTA pro g Zellmasse. Die alkalische Behandlung der Zellen mit NaOH führt zur Ionisierung zahlreicher geladener Gruppen, was zu einer starken Abstoßung der Komponenten innerhalb der EPS-Schicht und damit zu deren Zusammenbruch führt (Nielsen & Jahn, 1999). Durch die Behandlung mit EDTA werden divalente Kationen wie Ca²⁺ und Mg²⁺ komplexiert und damit aus den EPS entfernt. Divalente Kationen verlinken in EPS geladene Komponenten und ihr Fehlen führt zum Zusammenbruch der EPS-Matrix (Nielsen & Jahn, 1999). Die Zugabe von Schwefelsäure führt zu saurerer Hydrolyse der EPS-Komponenten (Watanabe *et al.*, 1998). Alle Ansätze wurden 3 h auf Eis inkubiert, anschließend bei 22000 g 15 min zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Sie wurden bei zweimaligem Pufferwechsel über Nacht gegen

rH₂O dialysiert (MWCO 3500 Da) und dann entweder sofort in Analysen eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

8.2.2 Physikalische Methoden

Auch mit zwei physikalischen Methoden - Zentrifugation und Erhitzen - wurde versucht, EPS zu extrahieren. Dafür wurden 100 mL Kultur wie in Abschnitt 8.2.2 beschrieben mit 0,9 % NaOH gewaschen und das Sediment anschließend in 10 mL rH₂O resuspendiert. Der Ansatz wurde dann bei 37000 g für 1 h zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in weitere Analysen eingesetzt. Für die Extraktion durch Erhitzen wurden 100 mL Kultur wie beschrieben behandelt, allerdings wurden sie statt des einstündigen Zentrifugationsschrittes für 1 h auf 70 °C erhitzt. Danach wurde der Ansatz bei 22000 g 15 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in weitere Analysen eingesetzt.

8.2.3 Kombination aus chemischer und physikalischer Methode

In einer weiteren Extraktion wurden eine chemische und eine physikalische Methode kombiniert. Die Extraktion wurde im Wesentlichen wie bei Gehrke *et al.*, 1998 beschrieben durchgeführt. Dafür wurden 100 mL Kultur bei 4000 g für 10 min zentrifugiert und das Sediment in 10 mL Zwittergentlösung resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 2000 g in einem RW28-Homogenisator (IKA, Staufen, Deutschland) behandelt, um die EPS durch Scheren und gleichzeitige chemische Behandlung zu extrahieren. Der Ansatz wurde bei 22000 g 15 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und über Nacht gegen rH₂O dialysiert (MWCO 3500 Da).

Zwittergentlösung

10 mM Tris-HCl, pH 7,0

10⁻³ mM N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane-sulfonate(Zwittergent 3-12)

1 mM EGTA

Ergebnisse

1 Untersuchungen zum Sox-Multienzymkomplex in *Alc. vinosum*

1.1 Sulfitoxidation in *Alc. vinosum*

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob auch die Proteine SoxB und SoxXA - und damit der gesamte Sox-Multienzymkomplex - in die Oxidation von Sulfit involviert sind. Zudem wurde eine Doppelmutante erzeugt, in der sowohl das Gen *soxY* als auch die für die APS-Reduktase kodierenden Gene *aprAB* inaktiviert wurden, um zu untersuchen, ob beide Sulfitoxidationswege sich gegenseitig ersetzen können.

1.1.1 Erzeugung der Mutanten *Alc. vinosum aprAB::Ω-Km* und *ΔsoxY-aprAB::Ω-Km*

Die Mutanten *Alc. vinosum aprAB::Ω-Km* und *ΔsoxY-aprAB::Ω-Km* wurden im Wesentlichen hergestellt wie in Dahl (1996) beschrieben. Vektor pNTS25, der das Gen *aprB*, in das eine Ω-Km-Kassette kloniert wurde, enthält, wurde mit Hilfe von *E. coli* S17-1 in *Alc. vinosum* Rif50 und *Alc. vinosum ΔsoxY* konjugiert. Die Identifizierung positiver Klone erfolgte wie bei Dahl (1996) beschrieben mittels Kolonie-PCR.

1.1.2 Sulfitoxidation in *Alc. vinosum sox-* und *aprAB*-Mutanten

Die Mutanten *Alc. vinosum soxBX::Ω-Km*, *soxX::Ω-Km*, *ΔsoxY+Y*, *aprAB::Ω-Km* und *ΔsoxY-aprAB::Ω-Km* wurden photolithoautotroph mit 5 mM Sulfit als einzigem Elektronendonator angezogen, wobei im Verlauf des Versuchs zweimal Sulfit nachgefüttert wurde, nachdem die 5 mM jeweils vollständig oxidiert waren. Da alle Wachstumsversuche zweimal durchgeführt wurden, stellen die gezeigten Sulfitoxidationsraten Mittelwerte aus sechs Oxidationsraten dar. Tabelle 6 gibt die Sulfitoxidationsraten für alle untersuchten Mutanten an und Abbildung 5 vergleicht die Oxidationsraten im prozentualen Verhältnis zueinander, wobei die Oxidationsrate des Wildtyps auf 100 % festgesetzt wurde. Die in den Abbildungen und Tabellen gezeigten Werte für den Wildtyp und die Mutante *Alc. vinosum ΔsoxY* stammen aus

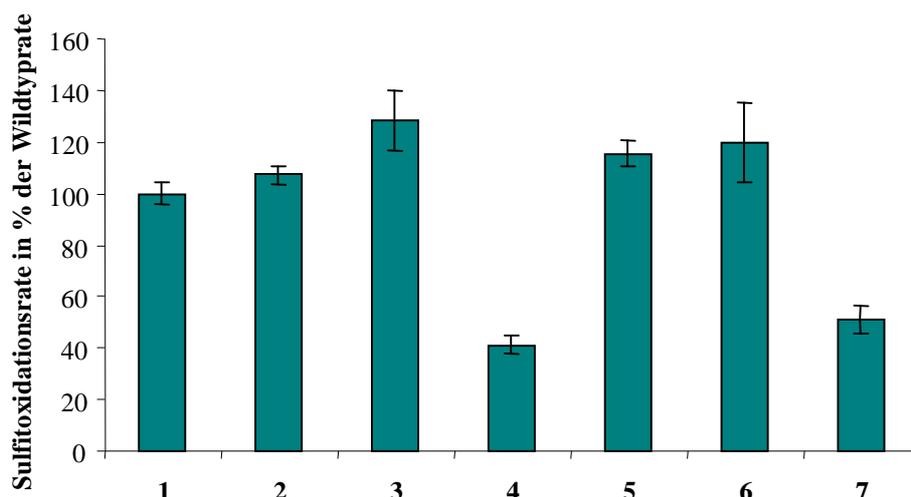


Abbildung 5. Relative Sulfitoxidationsraten des *Alc. vinosum* Wildtyps (1) und der *Alc. vinosum* Mutanten *soxBX::Ω-Km* (2), *soxX::Ω-Km* (3), Δ *soxY* (4), Δ *soxY* + *Y* (5), *aprAB::Ω-Km* (6) und Δ *soxY-aprAB::Ω-Km* (7).

Franz (2005). Die Wachstumserträge der gezeigten Kulturen waren vergleichbar und lagen bei 3 (mg Protein) (mmol SO_3^{2-})⁻¹ ± 0,5 (mg Protein) (mmol SO_3^{2-})⁻¹. Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, sind die Sulfitoxidationsraten der Mutanten *Alc. vinosum soxBX::Ω-Km* und *Alc. vinosum soxX::Ω-Km* mit 107 ± 4 % bzw. 128 ± 12 % vergleichbar zu denen des Wildtyps. Im Vergleich dazu ist die Oxidationsrate der Mutante *Alc. vinosum ΔsoxY* 60 % niedriger als die des Wildtyps. Das bedeutet, dass nicht der gesamte Sox-Multienzymkomplex Sulfit zu Sulfat oxidiert, sondern nur SoxYZ ist sowohl essentiell für die Thiosulfatoxidation als auch maßgeblich an der Sulfitoxidation beteiligt. Dass die reduzierte Sulfitoxidationsrate in der Mutante *Alc. vinosum ΔsoxY* tatsächlich auf das Fehlen von SoxYZ zurückzuführen ist, zeigt die bei 116 ± 5 % vom Wildtyp liegende Oxidationsrate der Komplementationsmutante *Alc. vinosum ΔsoxY+Y*. Wie schon bei Dahl (1996) weist die Mutante *aprAB::Ω-Km* mit 120 ± 15 % im Vergleich zur Wildtypoxidationsrate keine Beeinträchtigung in der Sulfitoxidation

Tabelle 6. Sulfitoxidationsraten des *Alc. vinosum* Wildtyps und verschiedener Mutanten.

<i>Alc. vinosum</i> Stamm	Sulfitoxidationsrate [nmol min ⁻¹ (mg Protein) ⁻¹]
Wildtyp	36,2 ± 1,6
<i>soxBX::Ω-Km</i>	46,4 ± 4,2
<i>soxX::Ω-Km</i>	38,8 ± 1,8
Δ <i>soxY</i>	14,9 ± 1,3
Δ <i>soxY</i> + <i>Y</i>	41,8 ± 1,7
<i>aprAB::Ω-Km</i>	43,4 ± 14,9
Δ <i>soxY-aprAB::Ω-Km</i>	18,4 ± 2,0

auf. Auch in der Doppelmutante *Alc. vinosum* Δ soxY-*aprAB*:: Ω -Km, führt das zusätzliche Fehlen der APS-Reduktase zu keinem weiteren Effekt auf die Sulfitoxidation. Das bedeutet, dass die APS-Reduktase unter den hier gewählten Kulturbedingungen keine nennenswerte Rolle in der Sulfitoxidation spielt und es statt dessen zusätzlich zu SoxYZ ein oder mehrere weitere Enzyme geben muss, die diesen Schritt im Schwefelstoffwechsel von *Alc. vinosum* bewerkstelligen können.

1.1.3 Untersuchung der Schwefelkugeln der Mutante *Alc. vinosum* Δ soxY

Das als Zwischenprodukt beim Abbau der intrazellulären Schwefelkugeln entstehende Sulfit konnte mit den etablierten HPLC-Methoden bisher in *Alc. vinosum*-Zellen nicht nachgewiesen werden. Da sich die deutliche Verringerung der Sulfitoxidationsrate in der Mutante *Alc. vinosum* Δ soxY auch auf die Oxidation des intrazellulär gespeicherten Schwefels auswirkt, so dass Sulfit ins Medium abgegeben wird (Hensen, 2006), wurden die Vorgänge in der Zelle zusätzlich mittels XANES-Spektroskopie untersucht, um gegebenenfalls auch Sulfit innerhalb der Zelle nachzuweisen. Hierfür wurden Zellpellets einer Kultur von *Alc. vinosum* Δ soxY, zu der 2 mM Sulfid gegeben worden waren 3 h, 27 h und 58 h nach der Zugabe von Sulfid gewonnen und in die XANES-Messungen eingesetzt. Die Zeitpunkte der Probennahme wurden so gewählt, dass die erste Probe vor der Ausscheidung von Sulfit ins Medium genommen wurde, die zweite zu einem Zeitpunkt, an dem Sulfit ins Medium ausgeschieden wurde, und als die dritte Probe gezogen wurde, war Sulfit beinahe vollständig wieder in die Zelle aufgenommen und zu Sulfat oxidiert (vergleiche Abbildung 27 im Abschnitt 2.1.4.1). Abbildung 6 zeigt die Referenzspektren von allen Substanzen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, um Probenspektren zu fitten. Für die in diesem Abschnitt gezeigten Fits wurden *cyclo*-Oktaschwefel, Polymerschwefel, Zinksulfat, reduziertes und oxidiertes Glutathion, Cysteinsäure und Methionin als Referenzsubstanzen verwendet. Die Untersuchungen der Zellpellets der Mutante *Alc. vinosum* Δ soxY brachten keine neuen Erkenntnisse. In den Pellets, die nach 3 und nach 27 h gewonnen wurden, war Polymerschwefel die dominierende Schwefelspezies (Abbildung 7: Spektrum a und b, Tabelle 7). Das entspricht den Ergebnissen, die auch Prange *et al.* (2002a) erhalten hatten. Die Autoren zeigten, dass die Schwefelkugeln von *Alc. vinosum* aus Polymerschwefelketten mit organischen Resten an den Enden bestehen. Achtundfünfzig Stunden nach der Zugabe von Sulfid ist kein Polymerschwefel mehr in den Zellen vorhanden (Abbildung 7: Spektrum c, Tabelle 7), da die Schwefelkugeln vollständig abgebaut wurden. Das entsprechende XANES-Spektrum konnte nur mit einem Satz an

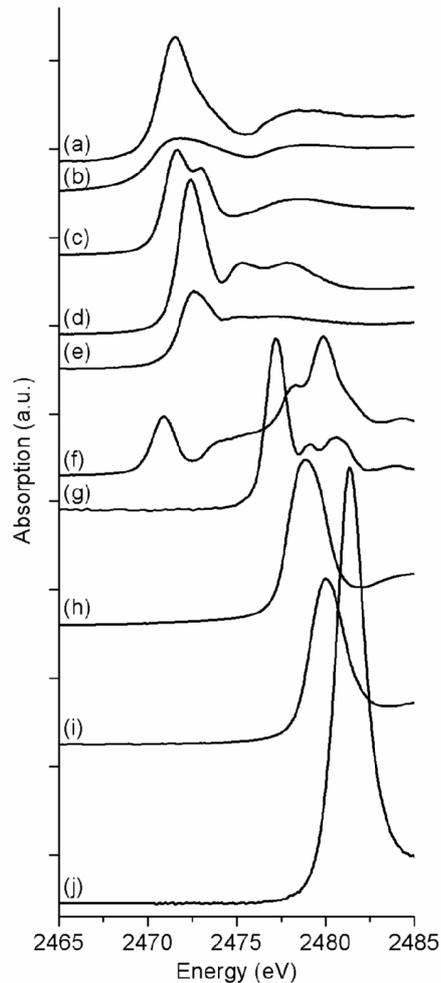


Abbildung 6. Schwefel-K-Kanten-Spektren der Referenzsubstanzen, die für das Fitten der Überstandsspektren und der Spektren der *Alc. vinosum* Δ soxY-Pellets in Abschnitt 1.3 verwendet wurden: Polymerschwefel (a), *cyclo*-Oktaschwefel (b), oxidiertes Glutathion (c), reduziertes Glutathion (d), Methionin (e), Natriumthiosulfat (f), Natriumsulfit (g), Methioninsulfon (h), Cysteinsäure (i) und Zinksulfat (j) (a.u. = arbitrary units).

Referenzsubstanzen gefittet werden, der sich etwas von dem für Spektrum a und b verwendeten unterschied. Während Polymerschwefel und *cyclo*-Oktaschwefel als Referenzen ausgeschlossen wurden, wurden stattdessen Methionin und oxidiertes und reduziertes Glutathion als Referenzen für C-S-S-C- bzw. C-S-H-Spezies verwendet. Dieser Referenzsatz repräsentierte die in schwefelkugelfreien Zellen vorhandenen Schwefelspezies, bei denen es sich vorwiegend um die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin und C-S-S-C- und C-S-H-Spezies handelt. Zusätzlich zu den wie in Prange *et al.* (2002a) beschrieben präparierten Zellpellets wurden auch Zellpellets vollständig unter anoxischen Bedingungen (d.h. unter Stickstoffatmosphäre) gewonnen und gemessen (Spektren und Fitdaten nicht vollständig gezeigt), um den Einfluss von atmosphärischem Sauerstoff auf die erhaltenen

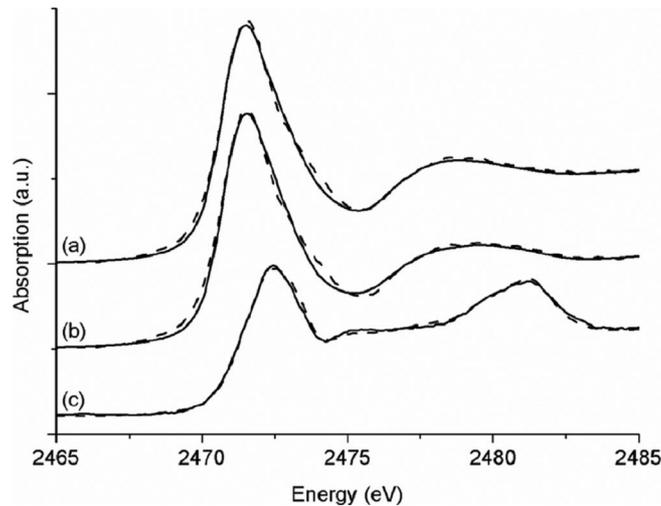


Abbildung 7. Schwefel-K-Kanten-XANES-Spektrum (durchgezogene Linien) der Zellpellets von *Alc. vinosum* Δ soxY-Kulturen vor (a), während (b) und nach dem Ausscheiden von Sulfid und die zugehörigen Fits (gestrichelte Linien). Die Proben wurden unter oxidischen Bedingungen präpariert. (a.u. = arbitrary units)

Tabelle 7. Ergebnisse des Fittens der Schwefel-K-Kanten-XANES-Spektren von *Alc. vinosum* Δ soxY-Kulturpellets an die Summe der Referenzspektren. Die Proben wurden unter oxidischen Bedingungen präpariert.

Referenzsubstanzen (Schwefelspezies)	Prozentuale Beiträge der Schwefelspezies*		
	nach 3 h	nach 27 h	nach 58 h
cyclo-Oktaschwefel (S ₈)	---	---	n.e.
Polymerschwefel (S _μ)	98	96	n.e.
Zinksulfat (SO ₄ ²⁻)	---	---	6
Glutathion (ox.) C-S-S-C	n.e.	n.e.	25
Glutathion (red.) C-S-H	n.e.	n.e.	15
Cysteinsäure (C-SO ₃ ⁻)	---	---	7
Methionin (C-S-C)	n.e.	n.e.	45

*verschiedene Schwefelspezies und ihr prozentualer Beitrag zur Schwefelspeziation; Fehler: $< \pm 10\%$; --- = Beitrag $< 2\%$; n.e. = nicht einbezogen

Ergebnisse auszuschließen. Diese Spektren und die zugehörigen Fitergebnisse zeigten nur geringfügige Unterschiede zu den unter oxidischen Bedingungen gemessenen Pellets. Das nach 58 h unter anoxischen Bedingungen gewonnene Zellpellet enthielt 6 % C-SO₃⁻, 30 % C-S-S-

C, 22 % C-S-H, 37 % C-S-C und 6 % SO₄, verglichen mit jeweils 7 %, 25 %, 15 %, 45 % und 6 % in Anwesenheit von Luftsauerstoff. Sulfid war allerdings weder unter oxidischen noch unter anoxischen Bedingungen in den Zellen nachweisbar, obwohl die Sulfidoxidation in Mutante *Alc. vinosum ΔsoxY* nur stark eingeschränkt stattfindet. Das deutet darauf hin, dass frei in der Zelle vorliegendes Sulfid sofort ins Medium abgegeben wird.

1.1.4 Suche nach einem weiteren sulfidoxidierenden Enzym

SoxYZ sollte in einem Strep-Protein-Interaktion-Experiment (SPINE) (Schmidt & Skerra, 2007) genutzt werden, um nach einem potentiellen sulfidoxidierenden Enzym zu suchen. Dazu wurde SoxYZ mit einem Strep-Tag versehen, damit potentielle Komplexpartner nach einer *in vivo* erfolgten Vernetzung zusammen mit SoxYZ gereinigt und identifiziert werden können. Im ersten Schritt wurde Vektor pSoxYZ_strep kloniert (Abbildung 8). Hierfür wurde die Gensequenz von *soxYZ* inklusive der davor liegenden Sequenz, in der der Promotor für diese beiden Gene vermutet wird, über die Schnittstellen *XbaI* und *NcoI* in den Vektor pPR-IBA1, kloniert, so dass Vektor pPR-SoxYZ_strep entstand. Anschließend wurde mittels *XbaI* und *HindIII* das Fragment inklusive Strep-Tag wieder aus pPR-SoxYZ_strep ausgeschnitten und in pBBR1MCS-2 kloniert, so dass nun ein in *Alc. vinosum* replizierbarer Vektor, der mit Strep-Tag versehenes *soxYZ* enthielt, zur Verfügung stand. Der Vektor wurde mit pSoxYZ_strep bezeichnet.

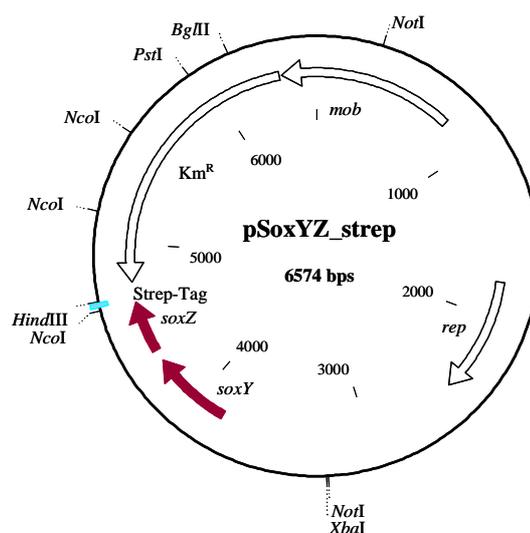


Abbildung 8. Vektor pSoxYZ_strep. Er enthält die Gene *soxYZ* an die sich die Sequenz für ein Strep-Tag anschließt, ist in *Alc. vinosum* mobilisierbar und dort replizierbar und trägt ein Kanamycinresistenzgen.

Dieser wurde dann mit Hilfe von *E. coli* S17-1 in *Alc. vinosum* Rif50 eingebracht und der Vektor mittels Kolonie-PCR mit Primern, die die Kanamycin-Kassette des Vektors zum Ziel hatten, in den entstandenen Mutanten nachgewiesen. Die Mutante *Alc. vinosum* + SoxYZ_strep wurde anschließend photoorganoheterotroph auf Malat sowie photolithoautotroph mit Thiosulfat oder Sulfid als Elektronendonoren angezogen. Die bei Wachstum mit Malat und Thiosulfat identifizierten Komplexe sollten im Vergleich mit den auf Sulfid erhaltenen Ergebnissen die Identifizierung eines für Sulfid spezifischen Proteins erleichtern. Nach 1 h (für Thiosulfat), nach 3 h (für Sulfid) und nach 3 Tagen (für Malat) Wachstum mit dem entsprechenden Elektronendonoren wurde *in vivo* verlinkt, die Zellen geerntet und anschließend SoxYZ und seine potentiellen Komplexpartner mit Hilfe des Strep-Tags gereinigt. Abbildung 9 zeigt die Elutionsfraktionen, von verschiedenen Reinigungen.

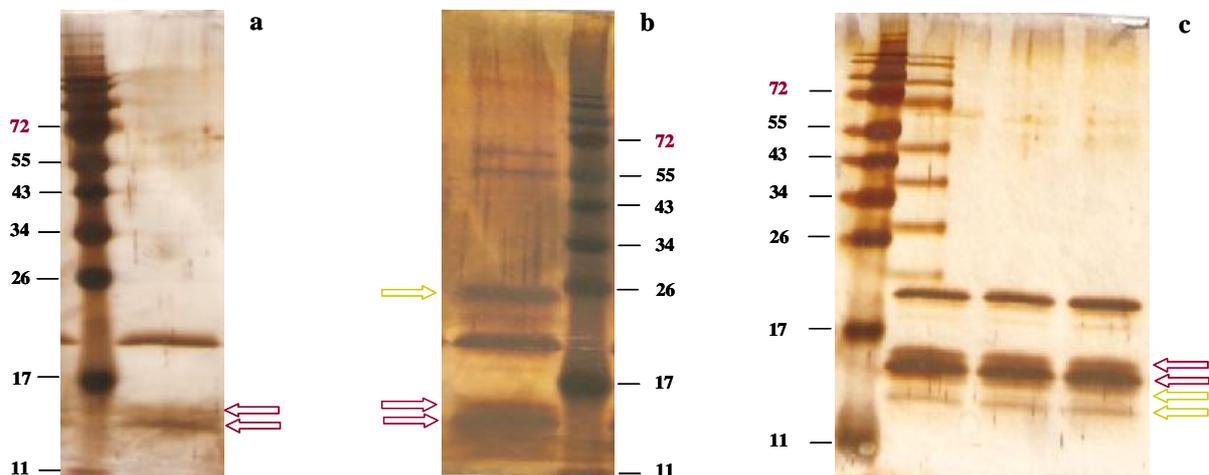


Abbildung 9. Elutionsfraktionen der Strep-Tag-Reinigung von SoxYZ aus *Alc. vinosum* + SoxYZ_strep. SoxYZ wurde ohne (a) und nach Verlinkung mit 0,6 % Formaldehyd bei Wachstum mit Thiosulfat (b) und Sulfid (c) als Elektronendonoren gereinigt. Rote Pfeile zeigen SoxYZ und grüne Pfeile durch die Verlinkung zusätzlich gereinigte Proteine.

Wird SoxYZ ohne vorherige Verlinkung mit Formaldehyd (in Abbildung 9 beispielhaft bei photoorganoheterotrophen Wachstum mit Malat gezeigt) gereinigt, sind in Elutionsfraktion 4 drei Proteine zu finden, wobei es sich bei den unteren beiden um SoxYZ (12,7 Da bzw. 12,3 Da) handelt. Zusätzlich findet sich in der Elutionsfraktion noch eine weitere unspezifische Bande bei ca. 20 kDa, die sich auch in allen anderen Reinigungen findet. Wächst *Alc. vinosum* + SoxYZ_strep mit Thiosulfat als Elektronendonoren und wird das mit Strep-Tag versehene SoxYZ vor der Reinigung *in vivo* mit möglicherweise vorhandenen Komplexpartnern verlinkt, fällt in der vierten Elutionsfraktion neben den Banden für SoxYZ und einigen

anderen, relativ schwachen Banden vor allem eine verhältnismäßig starke Bande bei ca. 25 kDa auf. Das zeigt, dass es prinzipiell möglich ist, mit SPINE auch in *Alc. vinosum* nach Interaktionspartnern von Proteinen zu suchen. Wird *Alc. vinosum* + SoxYZ_strep mit Sulfid als Elektronendonator angezogen und nach *in vivo*-Verlinkung daraus SoxYZ gereinigt, findet sich diese Bande in keiner der Elutionsfraktionen. Stattdessen sind zwei Banden direkt unterhalb von SoxYZ zu sehen. Allerdings finden sich beide auch in schwacher Form bei Wachstum von *Alc. vinosum* + SoxYZ_strep mit Thiosulfat, so dass es sich hier um mit SoxYZ verlinkte Proteine handelt, die nicht zwangsläufig der Sulfidoxidation zuzuordnen sind. Da die Oxidation von Sulfid in *Alc. vinosum* eher ein Randthema dieser Arbeit darstellte, wurde aus diesem Grund auf die weitere Untersuchung und Identifizierung dieser Proteine verzichtet.

1.2 Regulation der Transkription und Translation der *sox*-Gene in *Alc. vinosum*

1.2.1 Anordnung der *sox*-Gene im Genom von *Alc. vinosum*

Die für die essentiellen Proteine des Sox-Multienzymkomplexes codierenden Gene *soxB*, *soxX*, *soxA*, *soxK*, *soxY* und *soxZ* sind in *Alc. vinosum* in drei Transkriptionseinheiten, die teilweise noch weitere Gene enthalten, angeordnet (Hensen *et al.* 2006). An die Gene *soxXAK* schließen sich die Gene *soxL* und AlvinDRAFT_0668 (früher ORFb) an, wobei die Funktion des Genproduktes von letzterem noch unbekannt ist (Abbildung 10). Die größte Ähnlichkeit weist es zu einer HNH Endonuklease aus *Thioalkalivibrio* sp. HL-EbGR7 auf (NCBI Genbank Accessionnummer: YP_002513135, $E = 2 \cdot 10^{-38}$). Es liegt vermutlich ebenfalls in der selben Transkriptionseinheit wie *soxXA*, da erst im nachfolgenden AlvinDRAFT_0667 (früher ORFc) ein Sequenzabschnitt zu finden ist, der auf die Bildung einer Haarnadelstruktur

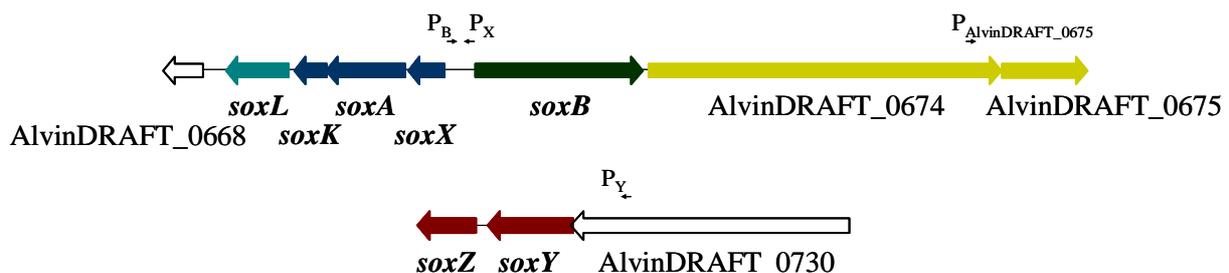


Abbildung 10. Anordnung der *sox*-Gene im Genom von *Alc. vinosum*.

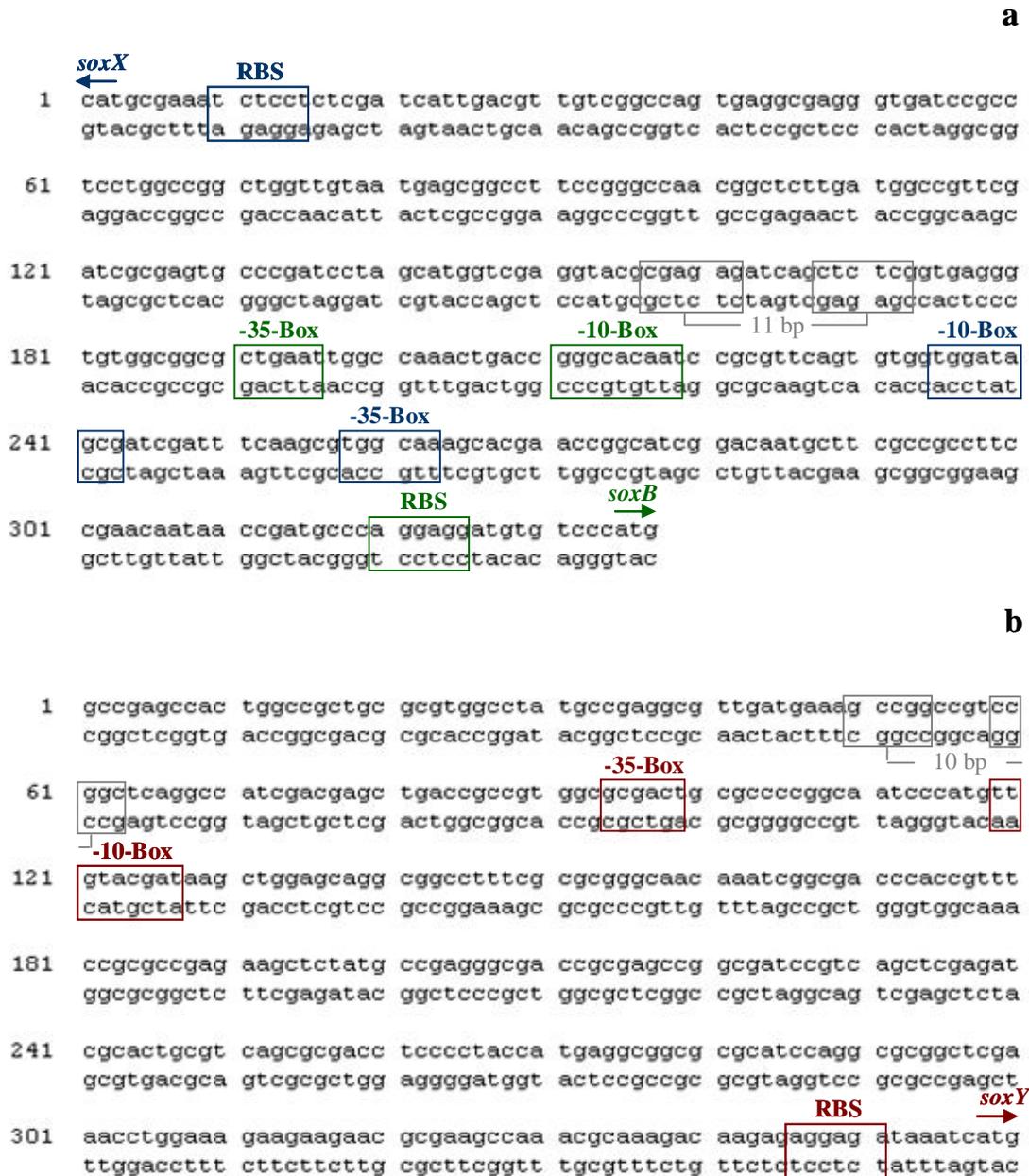


Abbildung 11. Potentielle Promotoren und Bindungssequenzen von Transkriptionsfaktoren für die Transkriptionseinheiten um *soxB* und *soxXAK* (a) und *soxYZ* (b).

hindeutet, die als Transkriptionsterminator fungieren könnte (Hensen *et al.*, 2006). AlvinDRAFT_0667 zeigte die größte Ähnlichkeit zu einer RNA-Methylase aus *Pelobacter carbinolicus* DSM 2380 (YP_357482, E = 0,0). Anschließend folgen mehrere Gene, die für Proteine der Cytochrom *c*-Biosynthese codieren.

In entgegengesetzter Richtung zur Transkriptionseinheit von *soxXA* liegt *soxB*. Die vermuteten Promotorbereiche sowohl für die Transkriptionseinheit von *soxXA* als auch für die von *soxB* liegen in dieser Region zwischen den Transkriptionseinheiten (Abbildung 11a). Eine Analyse dieses Bereiches mit BProm ergab einen möglichen Promotor 232 bp vor dem

Startcodon von *soxX* und einen 116 bp vor dem Startcodon von *soxB*. Auch die Promotorsuche mit Neuronal Networks Promoter Prediction ergab Promotoren in diesen Bereichen. Die mit Hilfe dieser Programme gefundenen Promotorbereiche unterschieden sich damit etwas von denen, die Hensen *et al.* (2006) bestimmt hatten. Hier lag der potentielle Promotor für *soxX* 244 bp vor dem Startcodon von *soxX* und der für *soxB* 72 bp vor dessen Startcodon. In der Region zwischen den Transkriptionseinheiten fiel zudem ein perfektes Palindrom auf, dessen beide invertierten, spiegelbildlich angeordneten Sequenzen einen Abstand von 11 bp hatten. Das entspricht der Ganghöhe von DNA. Solche Palindrome dienen als Bindungssequenz für Transkriptionsfaktoren (Unden, 2007).

Nach der Sequenzierung des Genoms von *Alc. vinosum* DSM 180^T sind nun auch die Sequenzen der an *soxB* anschließenden Gene bekannt. In der selben Transkriptionseinheit wie *soxB* liegt das Gen AlvinDRAFT_0674. Für das stromabwärtsliegende Gen AlvinDRAFT_0675 ergab die Promotorsuche mit BProm und Neuronal Networks Promoter Prediction einen eigenen Promotor. Dieser liegt 220 bp vor dem Startcodon von AlvinDRAFT_0675. In der Region um den Promotor fanden sich auch sehr viele palindromische Sequenzen, von denen eine als Bindesequenz für einen Transkriptionsfaktor dienen könnte. Das nachfolgende Gen AlvinDRAFT_0676 ist entgegengesetzt zu AlvinDRAFT_0675 orientiert und gehört damit nicht mehr zu dieser Transkriptionseinheit.

Die Gene *soxY* und *soxZ* liegen in einem gemeinsamen Transkriptionsabschnitt, der keine weiteren Gene enthält. Allerdings befindet er sich in einer anderen Region des Genoms von *Alc. vinosum* als die Abschnitte um *soxB* und *soxXA*. Für diese Transkriptionseinheit ergab die Analyse mit BProm und Neuronal Networks Promoter Prediction einen potentiellen Promotor 231 bp vor dem Startcodon von *soxY* (Abbildung 11b). Dreißig Basenpaare stromabwärts des Endes der potentiellen -35 Box liegt ein Palindrom, dessen invertierte, spiegelbildlich angeordnete Sequenzen 10 bp voneinander entfernt liegen, und somit ebenfalls als Bindesequenz für einen Transkriptionsfaktor dienen könnten.

Die für die sechs essentiellen Proteine des Sox-Multienzymkomplexes kodierenden Gene liegen also unter der Kontrolle von drei verschiedenen Promotoren, was einen gewissen regulatorischen Aufwand erfordern dürfte, um ihre gleichzeitige Produktion in stöchiometrischen Mengen zu gewährleisten. Um erste Erkenntnisse hierzu zu gewinnen, wurden daher im Folgenden die Transkription und Translation der *sox*-Gene unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht.

1.2.2 Transkription der *sox*-Gene

1.2.2.1 Herstellung von RNA-Standards für die real-time RT-PCR

Für die real-time RT-PCR stehen zwei generelle Quantifizierungsstrategien zur Verfügung: die absolute Quantifizierung und die relative Quantifizierung (Pfaffl, 2004). Die absolute Quantifizierung wird anhand einer gegebenen Kalibrierkurve durchgeführt, die auf einer Verdünnungsreihe von DNA oder RNA basiert. Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression des Zielgens auf ein weiteres, nicht reguliertes, so genanntes „Housekeeping Gen“ oder einen Housekeeping-Gen-Index, der sich aus mehreren Housekeeping-Genen zusammensetzt bezogen. Da über die Regulation von Genen in *Alc. vinosum* wenig bekannt ist, stand ein solches Housekeeping Gen für die relative Quantifizierung der Expression der *sox*-Gene in diesem Organismus nicht zur Verfügung. Auch der Vergleich mit 16S rRNA kam nicht in Frage, da die Expression von rRNA in Prokaryoten stark vom physiologischen Status der Zelle abhängt (Gourse *et al.*, 1996; Ruimy *et al.*, 1994). Somit blieb nur die absolute Quantifizierung der real-time RT-PCR-Produkte. Hierfür stellte sich die Frage, ob RNA- oder DNA-Standards gewählt werden sollten. Bei RNA-Standards durchlaufen sowohl die Standards als auch die Probe die reverse Transkription und die anschließende real-time PCR, während bei DNA-Standards die Standards im Gegensatz zur Probe nur die real-time PCR durchlaufen (Pfaffl & Hageleit, 2001). Das führt dazu, dass bei der Verwendung von DNA-Standards die Effizienz des Transkriptionsschrittes nicht berücksichtigt wird. Auf Grund der geringen RT-Effizienz führt dieser Schritt zu einer Reduktion des cDNA-Gehalts im Vergleich zum Ausgangs-RNA-Gehalt um 84 bis 98,6 % (Pfaffl & Hageleit, 2001), was zu viel zu niedrigen Werten bei der Bestimmung der Kopienzahlen des Zielgens führt (Fey *et al.*, 2004). Um dies zu umgehen, wurden für die Quantifizierung der Kopienzahlen der Gene *soxB*, *soxX* und *soxY* RNA-Standards verwendet. Hierfür wurden, wie in Fey *et al.* (2004) beschrieben, Primer verwendet, die ein Fragment erzeugten, das den zur Quantifizierung vorgesehenen Sequenzbereich und einen Teil der diese Sequenz flankierenden DNA-Bereich enthielt. Die so erzeugten PCR-Fragmente wurden anschließend mit Hilfe von T7-RNA-Polymerase in RNA transkribiert und in geeigneter Weise verdünnt. Abbildung 12 zeigt sowohl die für die Standards verwendeten DNA- als auch die RNA-Fragmente.

Mit den gewählten RNA-Standards für *soxB*, *soxX* und *soxY* konnten in allen drei Fällen Kalibriergeraden mit hoher Linearität (Korrelationskoeffizient $R^2 > 0,990$) über sechs Zehnerpotenzen (von 10^5 bis 10^{11} RNA-Molekülen) erstellt werden. Mit den gewählten

Primern für die Quantifizierung von *soxB*, *soxX* und *soxY* wurden spezifische Produkte erhalten.

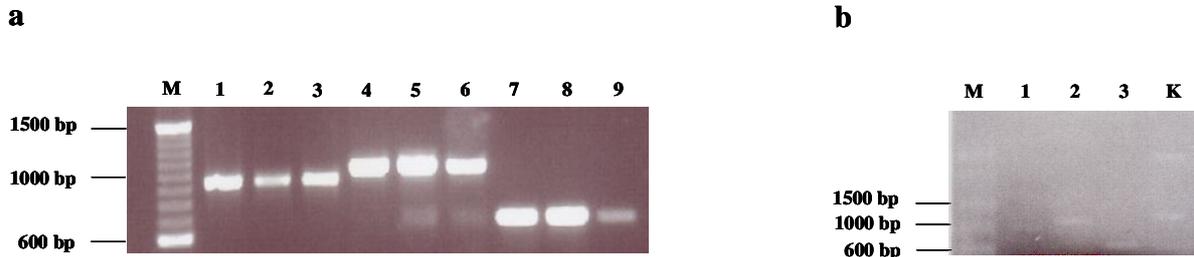


Abbildung 12. DNA-Templates (a) und RNA-Standards (b) für die real-time RT-PCR. a: 100 bp DNA-Leiter (M), *soxB* (1-3), *soxX* (4-6) und *soxY* (7-9); b: 100 bp RNA-Leiter (M), *soxB* (1), *soxX* (2), *soxY* (3), Transkriptionskontrolle (K).

1.2.2.2 Transkription der Gene *soxB*, *soxX* und *soxY*

1.2.2.2.1 Transkription in Anwesenheit verschiedener Elektronendonoren

Alc. vinosum wurde photolithoautotroph mit Sulfid, Thiosulfat oder Sulfit und photoorganoheterotroph mit Malat als Elektronendonoren angezogen. Zu geeigneten Zeitpunkten, an denen aufgrund vorhergehender Ergebnisse zur Oxidation der jeweiligen Elektronendonoren mit einer hohen Oxidationsrate zu rechnen war, wurde aus den Kulturen RNA isoliert (für Sulfid nach 30 min, für Thiosulfat nach 1 h, für Sulfit nach 3 h, für Malat nach 2 Tagen) und mittels quantitativer RT-PCR die Kopienzahlen der Gene *soxB*, *soxX* und *soxY* ermittelt. Auf eine Bestimmung der Kopienzahlen der Gene *soxA*, *soxK* und *soxZ* wurde verzichtet, da *soxA* mit *soxX* und *soxZ* mit *soxY* in einer Transkriptionseinheit liegt und es sich jeweils um Untereinheiten eines Proteins handelt und daher anzunehmen war, dass die Kopienzahlen vergleichbar sind.

Tabelle 8 und Abbildung 13 zeigen die Kopienzahlen für die drei Gene bei Wachstum mit den verschiedenen Elektronendonoren. Bei einem Wechsel von photoorganoheterotrophem Wachstum mit Malat auf photolithoautotrophes Wachstum mit Thiosulfat, dem Substrat des Sox-Multienzymkomplexes, erhöhte sich die Kopienzahl von *soxB* um das 6,2fache (Abbildung 13a). Auch Sulfid führte zu einer Vergrößerung der Kopienzahl. Sie stieg um das 4,8fache, während sie in Anwesenheit von Sulfit konstant blieb.

Ein ähnliches Bild ergab sich für *soxX* (Abbildung 13b). Beim Wechsel von photoorganoheterotrophem Wachstum auf Malat zu photolithoautotrophem mit Thiosulfat

C Ergebnisse

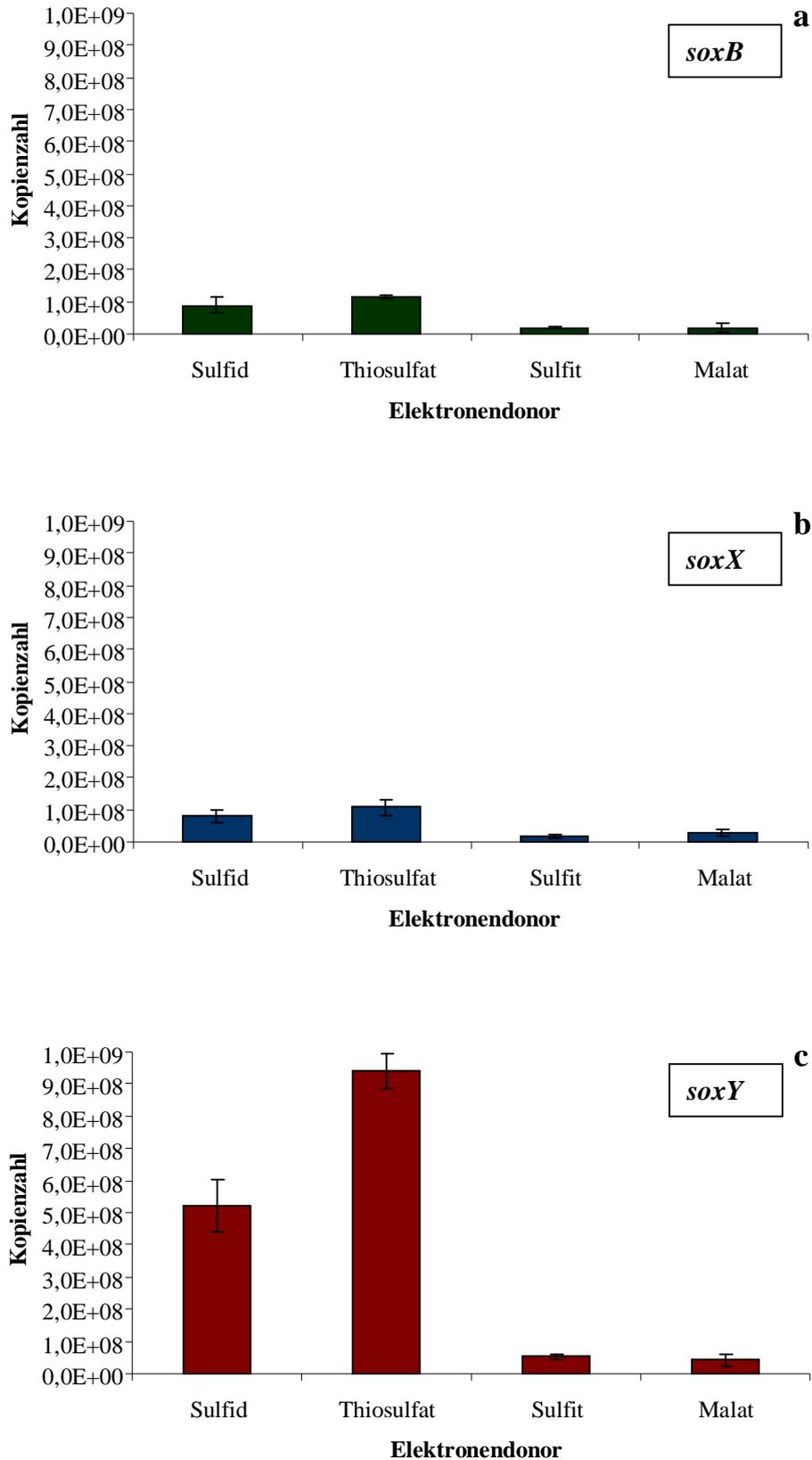


Abbildung 13. Kopienzahlen der Gene *soxB* (a), *soxX* (b) und *soxY* (c) bei Wachstum von *A. vinosum* mit den Elektronendonoren 2 mM Sulfid, 2 mM Thiosulfat, 5 mM Sulfit und 2 mM Malat, bestimmt mittels quantitativer real-time RT-PCR.

Tabelle 8. Kopienzahlen der Gene *soxB*, *soxX* und *soxY* bei Wachstum von *Alc. vinosum* mit 2 mM Sulfid, 2 mM Thiosulfat, 5 mM Sulfit, 2 mM Malat und 2 mM Sulfid + 2 mM Thiosulfat.

Elektronendonator	<i>soxB</i>	<i>soxX</i>	<i>soxY</i>
Sulfid	$9,00 \times 10^7 \pm 2,26 \times 10^7$	$8,05 \times 10^7 \pm 1,88 \times 10^7$	$4,11 \times 10^8 \pm 2,00 \times 10^7$
Thiosulfat	$1,15 \times 10^8 \pm 5,69 \times 10^6$	$1,08 \times 10^8 \pm 2,33 \times 10^7$	$5,22 \times 10^8 \pm 8,34 \times 10^7$
Sulfit	$1,81 \times 10^7 \pm 1,91 \times 10^6$	$1,68 \times 10^7 \pm 3,54 \times 10^6$	$9,39 \times 10^7 \pm 6,08 \times 10^6$
Malat	$1,86 \times 10^7 \pm 1,20 \times 10^7$	$2,80 \times 10^7 \pm 1,16 \times 10^6$	$5,17 \times 10^7 \pm 6,08 \times 10^6$
Sulfid + Thiosulfat	$7,53 \times 10^7 \pm 1,08 \times 10^7$	$6,08 \times 10^7 \pm 2,33 \times 10^6$	$1,42 \times 10^8 \pm 3,04 \times 10^7$

erhöhte sich die Kopienzahl um das 3,9fache. Bei Anwesenheit von Sulfid stieg die Kopienzahl um das 2,9fache, während sie für Sulfit wieder annähernd unverändert blieb.

Auch im Fall von *soxY* führte der Wechsel von Malat zu Thiosulfat als Elektronendonator zu eine Erhöhung der Kopienzahl (Abbildung 13c). Sie stieg um das 22,8fache. Auch Sulfid führte wiederum zu einem Anstieg der Kopienzahl, diesmal um das 12,7fache. In Anwesenheit von Sulfit erhöhte sich die Kopienzahl wiederum nur unwesentlich.

Verglich man die Kopienzahlen der drei Gene untereinander bei Wachstum mit den verschiedenen Elektronendonoren, fiel auf, dass *soxY* unter allen Kultivierungsbedingungen deutlich höhere Kopienzahlen erreichte als *soxB* und *soxX*. Während die Kopienzahlen für *soxB* und *soxX* unter allen Bedingungen sehr ähnliche Werte zeigten, lagen sie für *soxY* bei Wachstum auf Sulfid um das 5,8 bzw. 6,5fache, auf Thiosulfat um das 8,2 bzw. 8,7fache, auf Sulfit um das 2,6 bzw. 3,1fache und auf Malat um das 2,2 bzw. 1,5fache höher als die von *soxB* und *soxX*. Auffällig war dabei, dass das Verhältnis der Kopienzahlen von *soxY* zu denen von *soxB* und *soxX* nicht konstant war, sondern von Malat über Sulfit und Sulfid zum Thiosulfat anstieg. Für *soxY* erhöhten sich also die Kopienzahlen bei Wachstum auf Sulfid und Thiosulfat im Vergleich zu Wachstum auf Malat stärker als dies für *soxB* und *soxX* der Fall war.

1.2.2.2 Transkription bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sulfid und Thiosulfat

Sowohl Sulfid als auch Thiosulfat führten zu einer verstärkten Expression der *sox*-Gene. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, wie die Expression der *sox*-Gene reguliert wurde, wenn beide Elektronendonoren gleichzeitig zur Verfügung standen. Daher wurde *Alc. vinosum* photolithoautotroph mit Sulfid und Thiosulfat angezogen, nach 30 min die RNA der Kultur isoliert und wieder mittels quantitativer real-time RT-PCR die Kopienzahlen von *soxB*, *soxX* und *soxY* bestimmt. Abbildung 14 und Tabelle 8 zeigen die Kopienzahlen der Gene bei Wachstum auf Sulfid, Sulfid und Thiosulfat und Thiosulfat im Vergleich. Während die

Kopienzahlen von *soxB* und *soxX* denen bei Wachstum mit Sulfid als einzigem Elektronendonator ähnlich waren, nahm *soxY* eine Sonderrolle ein. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sulfid und Thiosulfat lagen die Kopienzahlen von *soxY* nur um 1,9 bzw. 2,3 mal höher als die von *soxB* und *soxX* und damit deutlich niedriger als bei Wachstum mit Sulfid oder Thiosulfat als einziger Schwefelquelle.

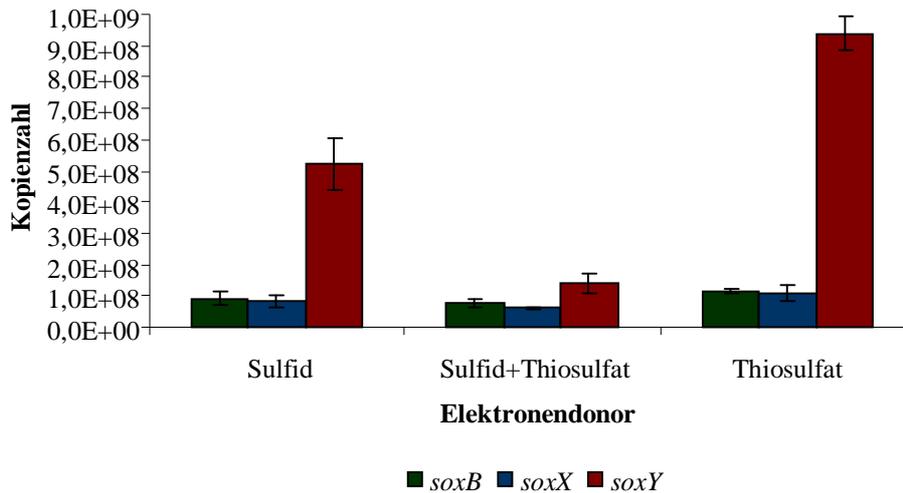


Abbildung 14. Kopienzahlen der Gene *soxB* (grün), *soxX* (blau) und *soxY* (rot) bei Wachstum mit 2 mM Sulfid, 2 mM Sulfid und 2 mM Thiosulfat oder 2 mM Thiosulfat als Elektronendonoren, bestimmt mittels quantitativer real-time RT-PCR.

1.2.2.2.3 Transkription in den Mutanten *Alc. vinosum soxB::Ω-Km*, *Alc. vinosum soxX::Ω-Km* und *Alc. vinosum ΔsoxY*

Da sich direkt im Anschluss an *soxB* und in der selben Transkriptionseinheit liegend ein Gen (AlvinDRAFT_0674) befindet, das für ein Protein codiert, das durch BLAST (Altschul *et al.*, 1997; Altschul *et al.*, 2005) als möglicher Bestandteil eines Zwei-Komponenten-Regulationssystems identifiziert wurde (Hensen *et al.*, 2006), wurde die Transkription der Mutante *Alc. vinosum soxB::Ω-Km* untersucht. In dieser Mutante wurde in *soxB* eine Ω-Kanamycinkassette eingefügt, die auch die Transkription aller nachfolgenden Gene der selben Transkriptionseinheit - und somit auch die von AlvinDRAFT_0674 - unterbinden sollte. Somit konnte untersucht werden, ob AlvinDRAFT_0674 Einfluss auf die Regulation des Sox-Multienzymkomplexes hat. Da die für die quantitative real-time PCR gewählten Primer vor der Ω-Kanamycinkassette lagen, konnten auch für *soxB* Kopienzahlen bestimmt werden.

Abbildung 15 vergleicht die Kopienzahlen der Gene *soxB*, *soxX* und *soxY* des auf Malat gewachsenen Wildtyps mit denen der auf Malat angezogenen Mutante *Alc. vinosum*

soxB::Ω-Km. Tabelle 9 zeigt die dazugehörigen RNA-Kopienzahlen der Mutante und des Wildtyps. Die Kopienzahlen der Mutante waren bei Wachstum auf Malat deutlich höher als im Wildtyp. Für *soxB* fanden sich 4,4 mal mehr mRNA-Moleküle als im Wildtyp, für *soxX* waren die Kopienzahl um das 14,7fache erhöht und für *soxY* um das 8,8fache. Das deutete darauf hin, dass das in AlvinDRAFT_0674 codierte Protein Einfluss auf die Expression der Gene des Sox-Multienzymkomplexes hatte, wobei dieser auf *soxX* am stärksten und auf *soxB*, das in der selben Transkriptionseinheit wie AlvinDRAFT_0674 liegt, am schwächsten war.

Tabelle 9. Kopienzahlen der Gene *soxB*, *soxX* und *soxY* der Mutanten *Alc. vinosum soxB::Ω-Km*, *Alc. vinosum soxX::Ω-Km* und *Alc. vinosum ΔsoxY* bei Wachstum mit 2 mM Malat und 2 mM Thiosulfat als Elektronendonator, bestimmt mittels quantitativer real-time RT-PCR.

Elektronendonator	<i>soxB</i>	<i>soxX</i>	<i>soxY</i>
<i>Alc. vinosum</i> Wildtyp			
Malat	$1,86 \times 10^7 \pm 1,20 \times 10^7$	$2,80 \times 10^7 \pm 1,16 \times 10^6$	$5,17 \times 10^7 \pm 6,08 \times 10^6$
Thiosulfat	$1,15 \times 10^8 \pm 5,69 \times 10^6$	$1,08 \times 10^8 \pm 2,33 \times 10^7$	$5,22 \times 10^8 \pm 8,34 \times 10^7$
<i>Alc. vinosum soxB::Ω-Km</i>			
Malat	$8,17 \times 10^7 \pm 5,71 \times 10^7$	$4,12 \times 10^8 \pm 2,16 \times 10^8$	$3,63 \times 10^8 \pm 4,10 \times 10^7$
Thiosulfat	$2,00 \times 10^8 \pm 2,21 \times 10^7$	$6,76 \times 10^8 \pm 2,40 \times 10^7$	$6,32 \times 10^8 \pm 7,99 \times 10^7$
<i>Alc. vinosum soxX::Ω-Km</i>			
Malat	$4,48 \times 10^7 \pm 2,54 \times 10^6$	$2,18 \times 10^7 \pm 2,70 \times 10^6$	$1,78 \times 10^8 \pm 1,33 \times 10^7$
Thiosulfat	$5,74 \times 10^7 \pm 5,94 \times 10^6$	$6,22 \times 10^8 \pm 6,20 \times 10^7$	$4,47 \times 10^8 \pm 2,23 \times 10^7$
<i>Alc. vinosum ΔsoxY</i>			
Malat	$1,54 \times 10^7 \pm 1,35 \times 10^6$	$2,54 \times 10^7 \pm 7,34 \times 10^6$	---
Thiosulfat	$8,48 \times 10^7 \pm 1,15 \times 10^7$	$9,45 \times 10^7 \pm 2,33 \times 10^7$	---

Auch beim Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante bei Wachstum mit Thiosulfat als Elektronendonator zeigten sich Unterschiede (Abbildung 15a). Für *soxB* ergab sich in der Mutante eine geringfügige Erhöhung der Kopienzahl um das 1,7fache, während diese für *soxX* deutlich größer ausfiel. Hier lagen in der Mutante 6,3 mal mehr mRNA-Moleküle vor als im Wildtyp. Das Gen *soxY* wurde dagegen in der Mutante etwas niedriger exprimiert als im Wildtyp. Die Kopienzahl in der Mutante lag 1,5fach niedriger als im Wildtyp.

In der Mutante lagen die Expressionslevel bei Wachstum auf Thiosulfat aber weiterhin etwas höher als die auf Malat erreichten (Abbildung 15a und b). Die Kopienzahl von *soxB* erhöhte sich bei einem Wechsel von photoorganoheterotrophem Wachstum auf Malat zu photolithoautotrophem Wachstum auf Thiosulfat um das 2,4fache, die von *soxX* um das 1,6fache und die von *soxY* um das 1,7fache. Damit fiel der Anstieg der Kopienzahl aber deutlich geringer aus als dies im Wildtyp der Fall war, wo der entsprechende Anstieg für die jeweiligen Gene bei 6,2, 3,9 und 22,8 lag. Zudem zeigten im Wildtyp *soxB* und *soxX* unter allen Wachstumsbedingungen vergleichbare Kopienzahlen, während die von *soxY* grundsätz-

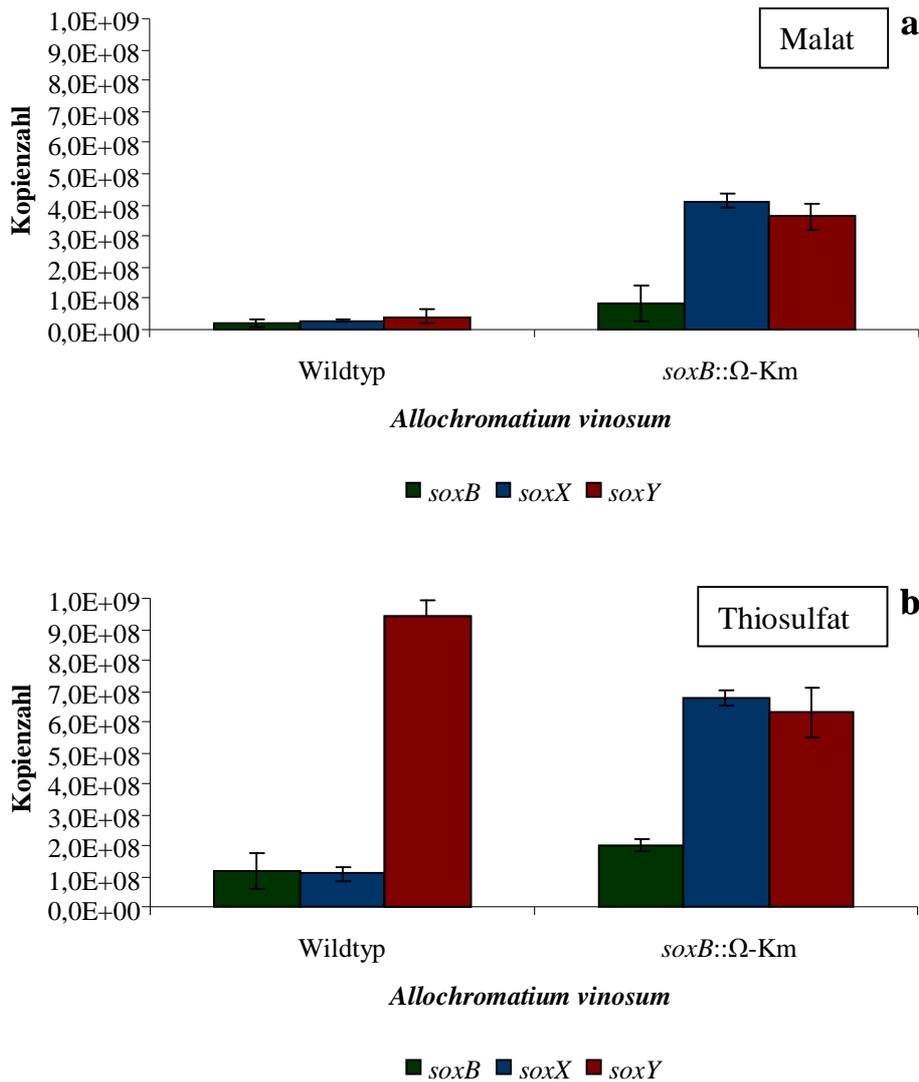


Abbildung 15. Kopienzahlen der Gene *soxB* (grün), *soxX* (blau) und *soxY* (rot) in *Alc. vinosum* Wildtyp und in der Mutante *Alc. vinosum soxB::Ω-Km* bei Wachstum mit 2 mM Malat (a) und 2 mM Thiosulfat (b) als Elektronendonator, bestimmt mittels quantitativer real-time RT-PCR.

lich höher lagen. Das ist bei einer Inaktivierung der Gene *soxB* und AlvinDRAFT_0674 nicht mehr der Fall. Statt dessen liegen nun die Kopienzahlen von *soxX* sowohl bei Wachstum auf Malat als auch bei Wachstum auf Thiosulfat höher als die von *soxY*. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass AlvinDRAFT_0674 für ein Protein codiert, das an der Regulation der Expression der Gene des Sox-Multienzymkomplexes beteiligt ist.

Auch in der Transkriptionseinheit von *soxXAK* liegen weitere Gene, die für verschiedene Proteine codieren, deren Rolle im Schwefelstoffwechsel von *Alc. vinosum* teilweise noch nicht vollständig geklärt ist (Hensen *et al.*, 2006). Um eine Beteiligung an der Regulation der Expression der Gene des Sox-Multienzymkomplexes auszuschließen, wurden auch die Expressionslevel der Gene *soxB*, *soxX* und *soxY* in der Mutante *soxX::Ω-Km* untersucht.

Diese trägt eine Ω -Kanamycinkassette in *soxX*, die auch die Transkription der nachfolgenden Gene unterbindet (Hensen et al., 2006). Auch hier lagen die Primer für die real-time PCR vor der Ω -Kanamycinkassette, so dass auch Kopienzahlen für *soxX* bestimmt werden konnten.

In Abbildung 16a ist wieder der Vergleich zwischen Mutante und Wildtyp bei Wachstum auf Malat zu sehen (Kopienzahlen der Mutante siehe Tabelle 9). Während sich für *soxB* eine etwas höhere Kopienzahl in der Mutante von 2,4 mal mehr mRNA-Molekülen und für *soxX* leicht niedrigere Kopienzahlen ergaben, war für *soxY* ein deutlicherer Unterschied zu erkennen. Hier lagen in der Mutante 4,3 mal mehr mRNA-Moleküle vor als im Wildtyp.

Beim Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante beim Wachstum auf Thiosulfat zeigte sich der größte Unterschied in der Expression des Gens *soxX* (Abbildung 16b). Während die Kopienzahl für *soxB* und *soxY* in der Mutante etwas niedriger waren, lagen die Kopienzahlen für *soxX* in der Mutante um das 4,1fache höher als im Wildtyp.

Wurden wieder die Kopienzahlen der drei Gene in der Mutante bei Wachstum auf Malat und Thiosulfat verglichen, war auch hier eine Erhöhung der Kopienzahlen bei photolithoautotrophen Wachstum mit Thiosulfat als Elektronendonator zu erkennen (Abbildung 16a und b). Das Expressionslevel von *soxB* stieg leicht um das 1,3fache. Für *soxX* war der Anstieg deutlich höher, hier lag die Kopienzahl bei Wachstum auf Thiosulfat um das 20,5fache höher als bei Wachstum auf Malat. Auch für *soxY* stieg die Kopienzahl bei Wachstum auf Thiosulfat. In diesem Fall nahm sie um das 3,5fache zu. Auch in dieser Mutante unterschied sich der Anstieg der Kopienzahlen beim Wechsel von photoorganoheterotrophen Wachstum auf Malat zu photolithoautotrophen Wachstum auf Thiosulfat deutlich von dem im Wildtyp (die entsprechenden Zahlen waren: *soxB* 6,2fach; *soxX* 3,9fach; *soxY* 22,8fach). Besonders auffällig war dabei, dass die Verhältnisse für *soxX* und *soxY* sich nahezu umdrehten. Während für *soxX* ein sehr starker Anstieg zu beobachten war, fiel dieser für *soxY* nun sehr viel schwächer aus. Dadurch änderten sich auch die Verhältnisse der Kopienzahlen der einzelnen Gene untereinander verglichen mit dem Wildtyp. Während die Anzahl der mRNA-Moleküle von *soxB* und *soxX* im Wildtyp sehr ähnlich war und die von *soxY* deutlich höher, lagen nun sowohl die Kopienzahlen von *soxY* als auch die von *soxX* signifikant höher als die von *soxB*. Die Insertion einer Ω -Kanamycinkassette und die daraus folgende Inaktivierung der Gene der Transkriptonseinheit von *soxXA* wirkt sich also deutlich auf die Expression von *soxX* und in geringerem Maße auch auf die Expression von *soxY* aus.

Auch eine mögliche Rolle von SoxYZ in der Regulation der Expression der Gene *soxB* und

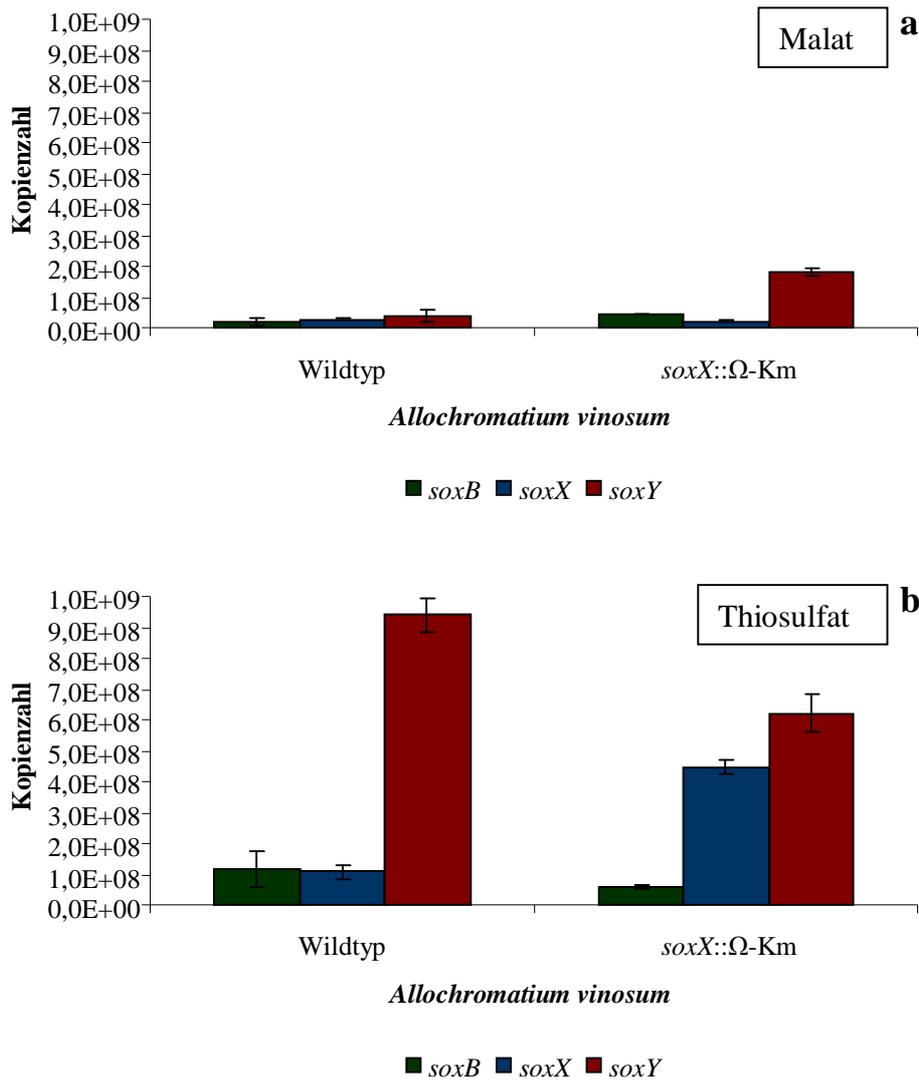


Abbildung 16. Kopienzahlen der Gene *soxB* (grün), *soxX* (blau) und *soxY* (rot) in *Alc. vinosum* Wildtyp und in der Mutante *Alc. vinosum soxX::Ω-Km* bei Wachstum mit 2 mM Malat (a) und 2 mM Thiosulfat (b) als Elektronendonator, bestimmt mittels quantitativer RT-PCR.

soxX wurde untersucht. Hierfür wurde die Mutante *Alc. vinosum ΔsoxY*, in der das Gen *soxY* deletiert wurde (Hensen *et al.*, 2006), auf Malat und Thiosulfat angezogen und aus beiden Kulturen RNA isoliert. Anschließend wurden die Kopienzahlen der Gene *soxB*, *soxX* und *soxY* wieder mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Wie Abbildung 17a (Kopienzahlen der Mutante siehe Tabelle 9) zeigt, waren die Werte der Kopienzahlen für *soxB* und *soxX* in der Mutante *Alc. vinosum ΔsoxY* bei Wachstum auf Malat denen im Wildtyp vergleichbar. Für *soxY* erhielt man auf Grund der Deletion des Gens kein Transkript.

Bei Wachstum auf Thiosulfat zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei Wachstum auf Malat (Abbildung 17b). Auch hier waren die Kopienzahlen von *soxB* und *soxX* in der Mutante denen im Wildtyp vergleichbar. Insgesamt waren die Kopienzahlen in der Mutante für beide

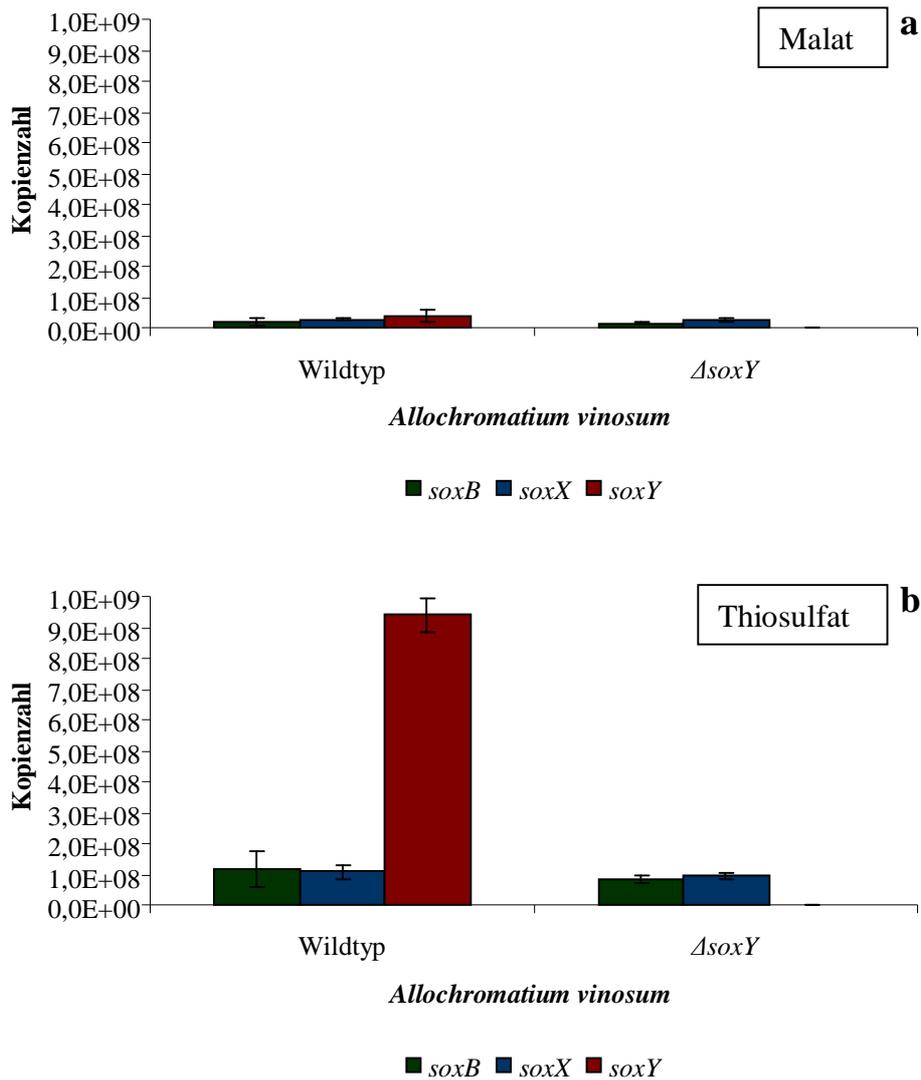


Abbildung 17. Kopienzahlen der Gene *soxB* (grün), *soxX* (blau) und *soxY* (rot) in *Alc. vinosum* Wildtyp und in der Mutante *Alc. vinosum* $\Delta soxY$ bei Wachstum mit 2 mM Malat (a) und 2 mM Thiosulfat (b) als Elektronendonator, bestimmt mittels quantitativer real-time RT-PCR.

Gene und unter beiden Wachstumsbedingungen etwas niedriger als im Wildtyp.

Im Vergleich zwischen den Kopienzahlen der Gene *soxB* und *soxX* in der Mutante bei Wachstum auf Malat und auf Thiosulfat (Abbildung 17a und b) war ein 5,5 fache bzw. 3,7fache Erhöhung der Kopienzahlen zu beobachten. Dies ähnelt der Situation im Wildtyp, wo für *soxB* die Kopienzahl beim Wechsel von Malat auf Thiosulfat auf das 6,2fache und für *soxX* auf das 3,9fache ansteigt. Auf Grund dieser Ergebnisse, kann eine regulatorische Funktion von SoxYZ auf transkriptionaler Ebene ausgeschlossen werden.

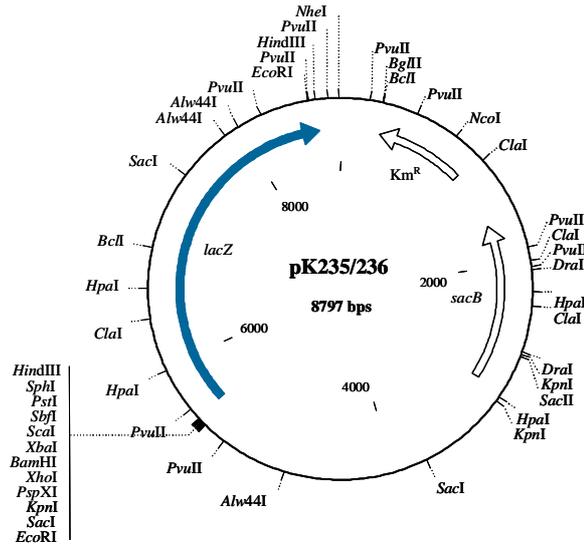
1.2.3 Translation der *sox*-Gene

1.2.3.1 Erzeugung der Mutanten *Alc. vinosum* Tl-*soxB*, Tl-*soxX* und Tl-*soxY*

Zusätzlich zur Transkription der Gene *soxB*, *soxX* und *soxY* wurde auch die Translation der Transkripte untersucht. Hierzu wurden Mutanten erzeugt, in die mittels single-cross-over ein Vektor eingebracht wurde, der den Promotorbereich des jeweiligen Gens und die nachfolgende DNA-Sequenz, die die Ribosomenbindestelle, das Startcodon und die Sequenz für die ersten acht Aminosäuren des jeweiligen Proteins enthielt. Daran schloss sich *in frame* das *lacZ*-Gen aus *E. coli* an, dem wiederum die Sequenz für die ersten acht Aminosäuren fehlte, so dass Transkription und Translation des Gens nun der des jeweiligen *sox*-Gens aus *Alc. vinosum* entsprachen. Anschließend konnte mittels eines β -Galactosidase-Assays die Produktion des Sox- β -Galactosidase-Fusionsproteins quantifiziert werden.

1.2.3.2 Herstellung der Vektoren pK235 und pK236

Zur Reporterengenfusion von *Alc. vinosum*-Genen mit *lacZ* aus *E. coli* musste ein Vektor konstruiert werden, der über Konjugation mit einem geeigneten *E. coli*-Stamm in *Alc. vinosum* übertragen werden kann. Hierfür wurde aus den Vektoren pPHU235 und pPHU236 (Hübner *et al.*, 1991) mittels *SalI* ein Fragment, das die multiple cloning site und das nachfolgende *lacZ*-Gen enthielt, ausgeschnitten und anschließend die überhängenden Enden mit Hilfe des Klenow-Fragments aufgefüllt. Durch weiteren Verdau mit *EcoRI* wurde ein überflüssiger Sequenzabschnitt entfernt und damit ein kleineres Fragment erzeugt, das nur noch die multiple cloning site und das *lacZ*-Gen enthielt. Dieses Fragment wurde in den Vektor pK18mobsacB ligiert, aus dem vorher mit Hilfe von *HindIII*, anschließendem Auffüllen der Schnittstelle mit Klenow-Fragment und weiterem Verdau mit *EcoRI* die multiple cloning site entfernt worden war. Damit war ein in *Alc. vinosum* konjugierbarer Vektor mit einer multiple cloning site entstanden, in die beliebige Gene so ligiert werden konnten, dass sie *in frame* mit dem nachfolgenden *lacZ*-Gen fusioniert werden (Abbildung 18).



pK235

EcoRI SacI KpnI XhoI BamHI XbaI ScaI PstI SphI HindIII ***
 GAATTCGAGCTCGGTACCCCTCGAGGGGGGGACCTTCTAGAGTCGAGTACTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGCTGCC
 Glu Phe Glu Leu Gly Thr Pro Lau Glu Gly Gly Ile Leu End Ser Arg Val Leu Asp Lau Gln Ala Cys Lys Lau Ala Ala

pK236

EcoRI SacI KpnI XhoI BamHI XbaI ScaI PstI SphI HindIII ***
 GAATTCGAGCTCGGTACCCCTCGAGGGGGGGACCTTCTAGAGTCGAGTACTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCGATGCC
 Aan Ser Ser Ser Val Pro Pro Ser Arg Gly Gly Ser Ser Arg Val Glu Tyr Ser Thr Cys Arg His Ala Ser Phe Asp Ala

Abbildung 18. Vektoren pK235 und pK236. Unten ist die translationale Gleichschaltung der Polylinkerregionen in den beiden Vektoren gezeigt. Schnittstellen sind überstrichen, die drei Sterne markieren das achte Codon des lacZ-Gens und die Aminosäuresequenz der übersetzten Polylinkerregion ist unter der DNA-Sequenz angegeben.

1.2.3.3 Herstellung und Überprüfung der Mutanten

Zur Erzeugung der Mutanten *Alc. vinosum* Tl-soxB und *Alc. vinosum* Tl-soxX wurden die Genregionen vor soxB und soxX, die die Promotorregion, die Ribosomenbindestelle, die Startcodonsequenz und die Sequenz für die ersten acht Aminosäuren des jeweiligen Proteins enthielten, in frame mittels der Schnittstellen PstI und HindIII in den Vektor pK235 ligiert. Für soxY wurde Vektor pK236 verwendet. Die so entstandenen Vektoren p235Tl-soxB, p235Tl-soxX und p236Tl-soxY wurden anschließend in E. coli S17-1 transformiert und in Alc. vinosum Rif50 konjugiert. Die entstandenen Single cross over-Mutanten wurden mit Hilfe von PCR auf das Vorhanden sein des aus pK18mobsacB stammenden Vektorrückgrats untersucht, für das mit den verwendeten Primern ein 900 bp großes Fragment zu erwarten war. Es konnten für alle drei Mutanten positive Klone identifiziert werden.

1.2.3.4 Translation in Anwesenheit verschiedener Elektronendonoren

Wie für die Untersuchung der Transkription wurde auch für die Translation zuerst die Auswirkung verschiedener Elektronendonoren auf die Produktion von SoxB, SoxX und SoxY untersucht. Hierfür wurde *Alc. vinosum* wieder photoorganoheterotroph auf Malat und photolithoautotroph auf Sulfid, Thiosulfat oder Sulfit angezogen und anschließend die spezifische β -Galactosidase-Aktivität der Sox-Fusionsproteine bei den jeweiligen Wachstumsbedingungen bestimmt.

Abbildung 19a und Tabelle 10 zeigen die spezifischen β -Galactosidase-Aktivitäten für das SoxB-Fusionsprotein. Beim Wechsel von photoorganoheterotrophem Wachstum mit Malat zu photolithoautotrophem Wachstum mit Thiosulfat als einzigem Elektronendonor erhöhte sich die spezifische β -Galactosidase-Aktivität um das 1,5fache. Für Sulfid und Sulfit verringerten sich die Aktivitäten im Vergleich zu Wachstum auf Malat dagegen um das 1,4fache.

Ein ähnliches Bild ergab sich für SoxX (Abbildung 19b; spezifische β -Galactosidase-Aktivitäten siehe Tabelle 10). Die spezifische β -Galactosidase-Aktivität stieg bei Wachstum auf Thiosulfat im Vergleich zu Wachstum auf Malat um das 1,6fache. Die spezifischen Aktivitäten bei Wachstum auf Sulfid und Sulfit lagen wieder geringfügig niedriger als die Werte für Wachstum auf Malat.

Tabelle 10. Spezifische β -Galactosidase-Aktivitäten in nmol *o*-Nitrophenol min⁻¹ mg⁻¹ der Gene *soxB*, *soxX* und *soxY* bei Wachstum von *Alc. vinosum* mit 2 mM Sulfid, 2 mM Thiosulfat, 5 mM Sulfit, 2 mM Malat und 2 mM Sulfid + 2 mM Thiosulfat.

Elektronendonor	<i>soxB</i>	<i>soxX</i>	<i>soxY</i>
Sulfid	8,50 ± 2,33	13,37 ± 0,66	46,47 ± 26,67
Thiosulfat	17,28 ± 3,15	25,14 ± 1,03	160,34 ± 27,03
Sulfit	8,69 ± 3,40	11,25 ± 1,45	38,06 ± 14,29
Malat	12,13 ± 1,34	15,67 ± 0,56	55,91 ± 13,37
Sulfid + Thiosulfat	9,38 ± 1,45	15,83 ± 1,20	22,32 ± 5,48

Wurde die Mutante Tl-*soxY* photolithoautotroph mit Thiosulfat angezogen, zeigte sie eine 2,9fach höhere spezifische β -Galactosidase-Aktivität im Vergleich zu photoorganoheterotrophem Wachstum auf Malat (Abbildung 19c; spezifische β -Galactosidase-Aktivitäten siehe Tabelle 10). Im Gegensatz dazu waren die Aktivitäten bei Wachstum auf Sulfid und Sulfit wie schon für die SoxB- und SoxX-Fusionsproteine niedriger als bei Wachstum auf Malat (1,2fach bzw. 1,5fach).

Vergleicht man die spezifischen β -Galactosidase-Aktivitäten von Tl-*soxB*, Tl-*soxX* und Tl-*soxY* jeweils bei Wachstum mit den verschiedenen Elektronendonoren untereinander, fällt auf,

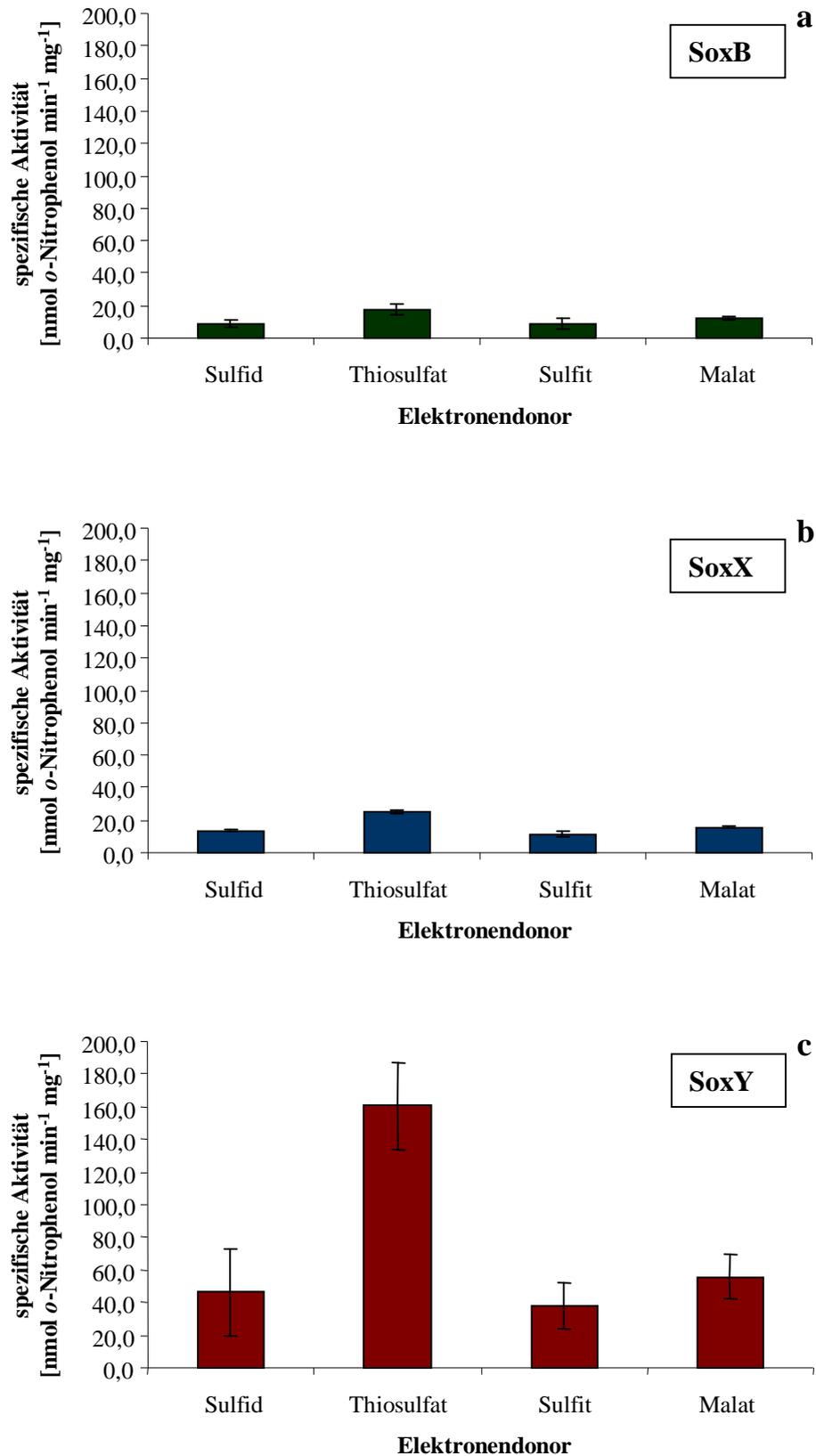


Abbildung 19. Spezifische Aktivitäten der β -Galactosidase-Fusionsproteine SoxB (a), SoxX (b) und SoxY (c) bei Wachstum mit 2 mM Sulfid, 2 mM Thiosulfat, 5 mM Sulfit und 2 mM Malat.

dass die Aktivitäten von SoxY deutlich höher waren, als die von SoxB und SoxX (Abbildung 19a, b und c). Diese waren sich wiederum sehr ähnlich. Bei Wachstum auf Sulfid lag die spezifische β -Galactosidase-Aktivität von SoxY 5,5 bzw. 3,5fach höher als die von SoxB und SoxX. Lag Thiosulfat als einziger Elektronendonator vor, erreichte SoxY eine 9,0 bzw. 6,4fach höhere Aktivität als SoxB und SoxX. Die Aktivität von SoxY erreichte bei Wachstum mit Sulfit 4,4 bzw. 3,4 und bei Verwertung von Malat 4,6 bzw. 3,5fach höhere Werte als die für SoxB und SoxX erreichten.

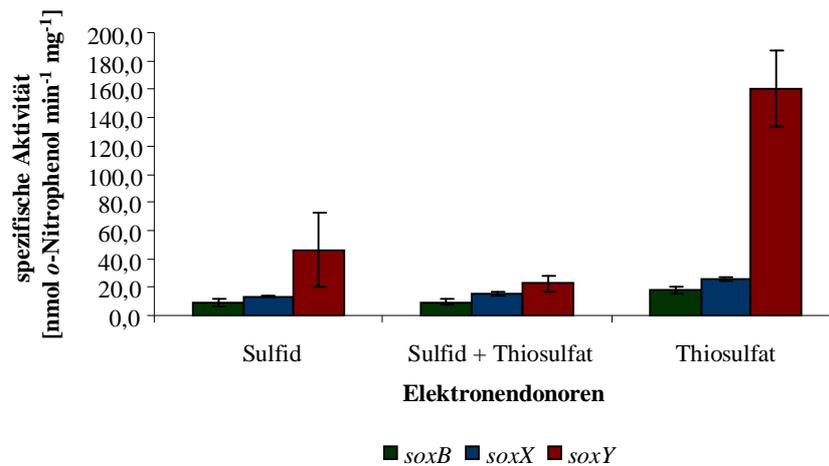


Abbildung 20. Spezifische Aktivitäten der β -Galactosidase-Fusionsproteine SoxB (grün), SoxX (blau) und SoxY (rot) bei Wachstum mit 2 mM Sulfid, 2 mM Sulfid und 2 mM Thiosulfat oder 2 mM Thiosulfat.

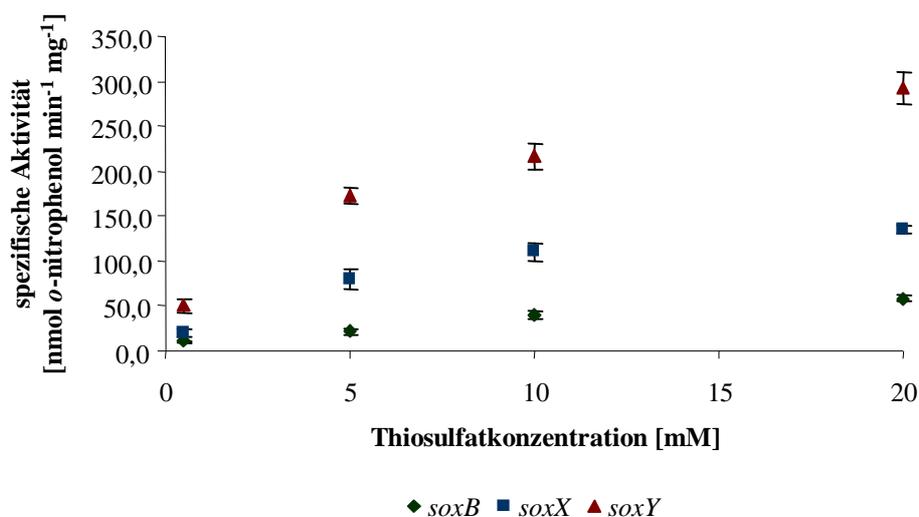


Abbildung 21. Spezifische Aktivitäten der β -Galactosidase-Fusionsproteine SoxB, SoxX und SoxY bei steigenden Thiosulfatkonzentrationen (0,5; 5; 10 und 20 mM).

1.2.3.5 Translation bei gleichzeitiger Anwesenheit von Sulfid und Thiosulfat

Wie für die Transkriptionsebene wurden auch die Auswirkungen von gleichzeitiger Anwesenheit von Sulfid und Thiosulfat auf die Translation von SoxB, SoxX und SoxY untersucht. Abbildung 20 zeigt die spezifischen β -Galactosidase-Aktivitäten der drei Fusionsproteine während der drei Wachstumsbedingungen im Vergleich (spezifische β -Galactosidase-Aktivitäten siehe Tabelle 10). Die Aktivitäten von SoxB und SoxX bei Wachstum mit Sulfid und Thiosulfat als Elektronendonator waren vergleichbar zu denen bei Wachstum mit Sulfid als einzigem Elektronendonator. SoxY wies dagegen im Vergleich zu SoxB und SoxX eine deutlich niedrigere Aktivität verglichen mit der bei Wachstum auf Sulfid auf. Sie lag nur noch 2,4 bzw. 1,4fach höher (im Vergleich zu 5,8 bzw. 6,5fach).

1.2.3.6 Abhängigkeit der Translation der *sox*-Gene von der Thiosulfatkonzentration

Des weiteren wurde untersucht, ob Transkription und Translation der *sox*-Gene abhängig von der Thiosulfatkonzentration sind. Hierfür wurden die Mutanten Tl-*soxB*, Tl-*soxX* und Tl-*soxY* mit 0,5, 5, 10 und 20 mM Thiosulfat angezogen und deren spezifische β -Galactosidase-Aktivitäten bestimmt. Abbildung 21 und Tabelle 11 zeigen die Ergebnisse für alle drei Mutanten. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl für SoxB als auch für SoxX und SoxY mit zunehmender Thiosulfatkonzentration auch die spezifischen β -Galactosidase-Aktivitäten ansteigen. Die Regulation von Transkription und Translation der *sox*-Gene bei Wachstum mit Thiosulfat erfolgt also konzentrationsabhängig. Wie schon in den vorhergehenden Versuchen liegen die spezifischen Aktivitäten von SoxB am niedrigsten, die von SoxX sind etwas höher und die SoxY-Aktivitäten erreichen die höchsten Werte.

Tabelle 11. Spezifische β -Galactosidase-Aktivitäten der Sox-LacZ-Fusionsproteine bei Wachstum von *Alc. vinosum* mit steigenden Thiosulfatkonzentrationen.

Thiosulfatkonzentration [mM]	SoxB	SoxX	SoxY
0,5	10,15 ± 0,81	20,02 ± 3,50	50,29 ± 8,18
5	21,05 ± 4,32	80,24 ± 11,51	172,10 ± 9,17
10	39,52 ± 3,83	109,74 ± 10,54	216,35 ± 14,00
20	57,78 ± 3,44	135,08 ± 4,77	291,71 ± 17,32

1.2.4. Sequenzvergleich von AlvinDRAFT_0674

Bei AlvinDRAFT_0674 handelt es sich um eine putative Multisensorhybridhistidinkinase. Die besteht aus 1253 Aminosäuren mit einer vorausgesagten Größe von 140513 Da und einem rechnerischen isoelektrischen Punkt von 5,10. Für das Protein werden weder ein Signalpeptid noch Transmembranhelices vorausgesagt, so dass es sich um ein im Cytoplasma lokalisiertes Protein handeln dürfte. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Hensen *et al.* (2006). AlvinDRAFT_0674 weist mehrere konservierte Domänen auf (Abbildung 22). In Richtung seines N-Terminus befinden sich zwei PAS-Domänen (CD Datenbanknummer cd00130). An diese schließen sich in Richtung C-Terminus eine HisKA (cd00082), eine HATPase_c-Domäne (cd00075) und abschließend zwei REC-Domänen (cd00156) an.

Mit Hilfe von BLAST (Altschul *et al.*, 1997; Altschul *et al.*, 2005) und ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) wurden zu AlvinDRAFT_0674 homologe Proteine gesucht und einige von ihnen anschließend über Sequenzalignments miteinander verglichen (Alignments siehe Anhang 1). Bei der Suche mittels BLAST fanden sich sehr viele homologe Proteine zu AlvinDRAFT_0674. Es handelte sich um potentielle Multisensorhistidinkinasen aus *Alpha*-Proteobakterien (z.B. *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, CAM77427; *Magnetococcus* sp. MC-1, YP_867301), *Beta*-Proteobakterien (z.B. *Chromobacterium violaceum* ATCC12472; *Leptothrix cholodnii* SP-6, YP_01792562), *Gamma*-Proteobakterien (z.B. *Shewanella putrefaciens* 200, ZP_1707790; *Yersinia aldovae* ATCC 35236, ZP_4618054; *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor str. N16961; NP_230993), *Delta*-Proteobakterien (z.B. *Desulfonatronospira thiodismutans* ASO3-1, ZP_03738052; *Desulfurivibrio alkaliphilus* AHT2, ZP_05709977) und *Epsilon*-Proteobakterien (*Sulfurospirillum deleyianum* DSM 6946, ZP_04422247), aber auch aus einem Vertreter der Gruppe *Fibrobacteres*/Acidobakterien (Candidatus *Koribacter versatilis* Ellin345, ZP_593133). Unter den Organismen, die ein Homologes zu AlvinDRAFT_0674 haben, fanden sich nur zwei weitere, die Thiosulfat oxidieren können: *Hlr. halophila* SL1 und *Magnetococcus* sp. MC-1. Beide bilden Schwefelkugeln aus Thiosulfat. Für die Sequenzalignments mittels ClustalW wurden daher die homologen Proteine aus diesen beiden Organismen und daneben noch einige andere, die besonders hohe Identitäten zu dem in *Alc. vinosum* gefundenen Protein aufweisen, verwendet. Die Ähnlichkeit zwischen AlvinDRAFT_0674 und den in *Hlr. halophila* SL1 und *Dts. thiodismutans* ASO3-1 ist mit Wahrscheinlichkeiten für eine zufällige Übereinstimmung mit der Sequenz von *Alc. vinosum* DSMZ¹⁸⁰ von 0,0 bzw. $1e^{-163}$ am größten. Das Sequenzalignment zeigt keine konservierten Bereiche für die Bereiche der Proteine, die die

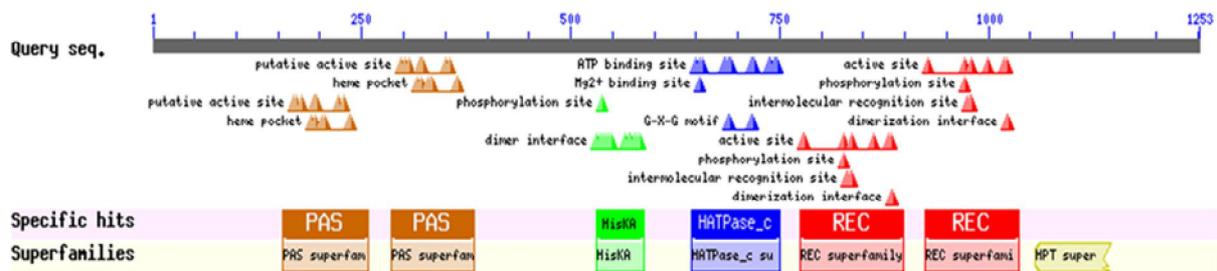


Abbildung 22. Putative konservierte Domänen im Genprodukt von AlvinDRAFT_0674.

PAS-Domänen enthalten. Als PAS-Domänen wurden die Sensor-Domänen verschiedener Sensor-Histidinkinasen zusammen gefasst. Die fehlenden konservierten Bereiche in dieser Zusammenstellung könnten darauf hindeuten, dass die gefundenen homologen Proteine sich in dem Reiz, der durch den Sensor registriert wird, unterscheiden. Vergleicht man nur die Sequenzen von AlvinDRAFT_0674 und seinem Homologen in *Hlr. halophila* so zeigen sich große Übereinstimmungen der Sensorbereiche beider Proteine. Alle verglichenen Proteine haben dagegen viele konservierte Bereiche in ihrer Primärstruktur, in dem Sequenzabschnitt, der den PAS-Domänen folgt. Die weitere Signalübermittlung, die sich an den durch das Protein registrierten Reiz anschließt, verläuft vermutlich in allen Proteinen ähnlich.

1.2.5 Sequenzvergleich von AlvinDRAFT_0675

Bei AlvinDRAFT_0675 handelt es sich um den putativen Regulator eines Zwei-Komponenten-Systems, ein 303 Aminosäuren langes Protein mit einer vorhergesagten Größe von 33906 Da und einem rechnerischen isoelektrischen Punkt von 5,78. Auch für dieses Protein konnten weder ein Signalpeptid noch Transmembranhelices nachgewiesen werden, so dass es sich bei AlvinDRAFT_0675 ebenfalls um ein cytoplasmatisches Protein handelt. Es weist zwei konservierte Domänen auf (Abbildung 23): eine REC-Domäne (cd00156) am N-Terminus und eine GGDEF-Domäne (cd01949) am C-Terminus. Die Eingabe der Sequenz in GYM2.0 (Narasimhan *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 1999) und Helix-turn-Helix Motif Prediction (Combet *et al.*, 2000) ergab in beiden Programmen DRLEQVAMQDGLTQIPNRRRFD als Sequenzbereich für ein Helix-turn-Helix-Motiv an. Allerdings wird der Score (2,08) bei der Bestimmung des Motivs bei Verwendung von Helix-turn-Helix Motif Prediction als nicht signifikant angesehen. Zudem vergleicht GYM2.0 die mit Hilfe des GYM-Algorithmus erhaltenen Ergebnisse mit solchen, die mit Hilfe der für die Vorhersage von Helix-turn-Helix-Motiven gängigen Dodd & Egan-Methode erhalten werden, welche ebenfalls die oben genannte Sequenz nicht als mögliche Primärstruktur für ein Helix-turn-Helix-Motiv einstuft.

Auch PleD, eine gut beschriebener Antwortregulator mit GGDEF-Domäne aus *Caulobacter crescentus*, bei dem es sich um ein Homologes von AlvinDRAFT_0675 handelt, weist kein Helix-turn-Helix-Motiv auf (Chan *et al.*, 2004). Vor diesem Hintergrund erscheint es daher fragwürdig, ob AlvinDRAFT_0675 tatsächlich ein DNA-bindendes Helix-turn-Helix-Motiv besitzt.

Auch für AlvinDRAFT_0675 ergab die Suche nach homologen Proteinen mittels BLAST (Altschul *et al.*, 1997; Altschul *et al.*, 2005) sehr viele Treffer. Wie für AlvinDRAFT_0674 ergaben sich die größten Ähnlichkeiten für putative Regulatoren aus *Dts. thiodismutans* ASO3-1 und *Hlr. halophila* - allerdings in umgekehrter Reihenfolge - mit Werten von $1e^{-102}$ bzw. $3e^{-95}$. Homologe zu AlvinDRAFT_0675 finden sich in nahezu allen Organismen, die

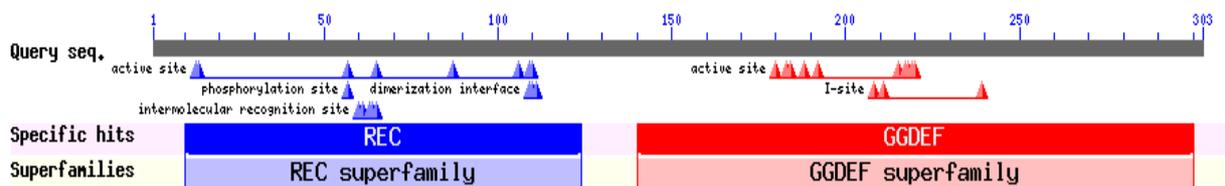


Abbildung 23. Putative konservierte Domänen im Genprodukt von AlvinDRAFT_0675.

auch Homologe zu AlvinDRAFT_0674 aufweisen. Zusätzlich gibt es auch ein Homologes in einem weiteren Schwefeloxidierer, *Beggiatoa* sp. PS (*Gamma*-Proteobakterium, ZP_02002049) und in einigen Cyanobakterien (z.B. *Cyanothece* sp. PCC 7822, ZP_03153815; *Lyngbya* sp. PCC 8106, ZP_01624532).

Für das Sequenzalignment wurden wieder die beiden Proteine aus *Dts. thiodismutans* ASO3-1 und *Hlr. halophila* mit der größten Ähnlichkeit zu AlvinDRAFT_0675 sowie die Proteine der Schwefeloxidierer *Magnetococcus* sp. MC-1 und *Beggiatoa* sp. PS, ein cyanobakterielles Protein aus *Cyanothece* sp. PCC 7822 und das Homologe aus *Swa. amazonensis* SB2B verwendet. Die Proteine weisen über ihre gesamte Primärstruktur sehr viele konservierte Aminosäuren auf. Das GGDEF-Motiv liegt in leicht modifizierter Form vor. Anstelle des Aspartat (D) findet sich Glutamat (E), allerdings handelt es sich bei beiden Aminosäuren um solche mit negativ geladenen Seitenketten. Die einzige Ausnahme in Bezug auf das GGDEF-Motiv stellt das Protein aus *Beggiatoa* sp. PS dar, bei dem sich statt des GGDEF- bzw. GGEEF-Motifs die Aminosäuresequenz EGDQF findet, was auf eine andere Funktion des Proteins als die der anderen in das Alignment einbezogenen Proteine hindeuten könnte.

2 Untersuchungen zur Verwertung von Elementarschwefel durch *Alc. vinosum* und andere Schwefelpurpurbakterien

Im Folgenden sollte der Einfluss der Schwefelspeziation auf die Verwertung von Elementarschwefel in verschiedenen Schwefelpurpurbakterien untersucht und geklärt werden, ob ein direkter Zell-Schwefel-Kontakt für die Verwertung von Elementarschwefel nötig ist. Zudem wurde der Einfluss verschiedener Inhibitoren und Entkoppler auf die Verwertung von Elementarschwefel in *Alc. vinosum* untersucht.

2.1 Einfluss der Schwefelspeziation auf die Verwertung von Elementarschwefel

2.1.1 Speziationsbestimmung von Elementarschwefel

Hierfür wurde zuerst die exakte chemische Speziation des Elementarschwefels zweier verschiedener Hersteller (im Folgenden mit S1 und S2 bezeichnet) mit Hilfe von XANES-Spektroskopie analysiert um das Verhältnis von S₈ Ringen zu Polymerschwefel zu bestimmen. Um die erhaltenen Spektren zu Fitten, wurden reiner Polymerschwefel und reiner S₈-Schwefel als Referenzsubstanzen verwendet (Spektren siehe Abbildung 6). In Abbildung 24 sind die Schwefel-K-Kanten XANES Spektren von S1 und S2 und ihre korrespondierenden Fits zu sehen. Die quantitative Analyse der Spektren zeigte, dass sich S1 und S2 signifikant in ihren jeweiligen prozentualen Beiträgen von S₈-Ringen und Polymerschwefel zum Spektrum unterschieden. Während S1 einen Polymerschwefelanteil von 68 % hatte, lag dieser in S2 mit 39 % deutlich niedriger. Der Anteil an S₈-Ringen beträgt entsprechend in S1 30 % und in S2 62 %. Der Fehler der quantitativen Analyse der Spektren konnte mit ± 10 % angegeben werden. Dieser Schwefel mit nun bekannter Speziation wurde im Folgenden in den Wachstumsversuchen mit verschiedenen Vertretern der Schwefelpurpurbakterien eingesetzt. Zuvor wurde er aber unter den Kulturbedingungen, die für die *Chromatiaceae* genutzt werden sollten, im Medium ohne Bakterien gerührt. Direkt nach der Zugabe zum Medium bildete der Elementarschwefel auf der Oberfläche hydrophobe Klumpen, aber durch das kontinuierliche Rühren konnte er innerhalb von 3 h in feinen Partikeln im Medium dispergiert werden. In dieser Form lag er dann auch während weiterer 156 h vor. Eine wie weiter unten in den Wachstumsversuchen beschriebene Bildung von Schwefelplättchen konnte in Abwesenheit

von Bakterien nicht beobachtet werden.

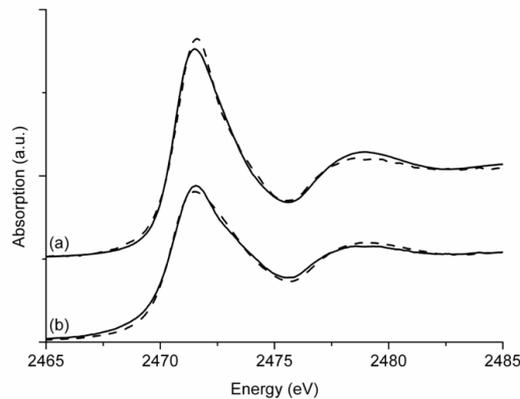


Abbildung 24. Schwefel-K-Kanten-XANES-Spektren (durchgezogene Linien) von Elementarschwefel S1 (a) und Elementarschwefel S2 (b), die in den in dieser Arbeiten gezeigten Wachstumsversuchen eingesetzt wurden, und ihre zugehörigen Fits (gestrichelte Linien). a.u.: Arbitrary units

2.1.2 Einfluss der Schwefelspeziation auf die Elementarschwefelverwertung durch *Chromatiaceae*

Als Beispiele für Vertreter der Familie der *Chromatiaceae* wurden *Alc. vinosum* und *Tca. roseopersicina* untersucht.

2.1.2.1 *Allochromatium vinosum*

Alc. vinosum wurde photolithoautotroph mit 50 mM S1 oder S2 als einziger Schwefelquelle kultiviert. Nach der Zugabe des Schwefels konnte die oben beschriebene Dispersion des Elementarschwefels in der Kulturflüssigkeit beobachtet werden. Die Anwesenheit der Elementarschwefelpartikel in der Kulturflüssigkeit verursachte allerdings Probleme mit der Schwefelquantifizierung während des Versuchs. *Alc. vinosum* akkumulierte intrazelluläre Schwefelkugeln als obligates Intermediat der Elementarschwefeloxidation. Da die schwefelhaltigen Zellen bei diesem Versuchsaufbau vollständig von dem als Substrat zugesetzten, fein verteilten Elementarschwefel umgeben waren, war eine quantitative Trennung der schwefelhaltigen Zellen vom zugesetzten Schwefel nicht möglich. Der zeitliche Verlauf der Schwefelkonzentrationen außerhalb und innerhalb der Zelle konnte daher nicht bestimmt werden. Stattdessen wurden die Bildung und der nachfolgende Abbau der intrazellulären Schwefelkugeln, die der Aufnahme des zugesetzten Elementarschwefels folgten, mikroskopisch beobachtet und indirekt über die Bestimmung des finalen Oxidations-

produkts Sulfat quantifiziert. Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration der Kulturen als Indikator für das Wachstum der Zellen bestimmt.

Drei Stunden nach Zugabe von S1 bildete *Alc. vinosum* erste Schwefelkugeln. Eine weitere Zunahme der Menge an intrazellulärem Schwefel konnte während der nächste 9 h unter dem Mikroskop beobachtet werden. Die Oxidation des intrazellulär gespeicherten Schwefels zu Sulfat begann 12 h nach der Zugabe von S1 und im Laufe der folgenden 120 h wurden die Schwefelkugeln vollständig abgebaut und zu Sulfat oxidiert (Tabelle 12). Während dieser Zeit stieg die Proteinkonzentration der Kultur von 0,106 auf 0,738 mg mL⁻¹ (Tabelle 13), was auf ein Wachstum von *Alc. vinosum* mit Elementarschwefel als Elektronendonator hinwies. In den nachfolgenden 24 h wurden keine weitere Aufnahme von Elementarschwefel und Oxidation von intrazellulärem Schwefel beobachtet, obwohl weiterhin zugesetzter Elementarschwefel in der Kulturflüssigkeit vorlag. Dieser hatte nun die Form kleiner Plättchen, die sich ab etwa

Tabelle 12. Schwefelbestimmung und lichtmikroskopische Beobachtung der Schwefelkugelbildung in *Alc. vinosum*-Kulturen, die mit Schwefel S1 und Schwefel S2 gefüttert wurden. Die %-Werte in Klammern geben die relative Menge an Schwefel verglichen mit den gesamten 50 mM in der Kultur, die als Sulfat wieder gefunden wurde, an.

gefüttert mit		Zeit [h]							
		0	3	12	84	114	132	156	267
S1	Sulfat (mM)	0,0 (0%)	0,0 (0%)	0,2 (0.4%)	18,2 (36%)	27,9 (56%)	37,3 (74%)	37,3 (74%)	n.b. ⁺
	Schwefelkugeln	---*	ja	ja	ja	ja	---*	---*	n.b. ⁺
S2	Sulfat (mM)	0,0 (0%)	0,0 (0%)	0,1 (0.2%)	16,2 (32%)	22,6 (45%)	22,6 (45%)	22,6 (45%)	22,6 (45%)
	Schwefelkugeln	---*	ja	ja	ja	---*	---*	---*	---*

* keine Schwefelkugeln beobachtet

+ n.b.; nicht bestimmt

Tabelle 13. Proteinkonzentration in mg mL⁻¹ der mit Schwefel S1 und S2 gefütterten *Alc. vinosum*-Kulturen.

gefüttert mit		Zeit [h]							
		0	3	12	84	114	132	156	267
Proteinkonzentration [mg/mL]	S1	0,106	0,141	0,202	0,469	0,561	0,702	0,738	n.b. ⁺
	S2	0,048	0,059	0,062	0,263	0,265	0,245	0,252	0,229

+ n.b.: nicht bestimmt

30 h nach der Zugabe von S1 gebildet hatten. Passend zu dieser Beobachtung konnten nur 37 mM Sulfat nachgewiesen werden (Tabelle 12), während man 50 mM Sulfat erwartete, wenn der zugegebene Elementarschwefel komplett aufgenommen und vollständig oxidiert wird. Das zeigt, dass nur 74 % der 50 mM zugegebenen Elementarschwefels aufgenommen und zu Sulfat oxidiert wurden. Berücksichtigt man den Fehler von $\pm 10\%$ der quantitativen Analyse der XANES Spektren von S1, entspricht dieser Anteil dem Polymerschwefelanteil von 68 % im zugegebenen Elementarschwefel. Nach dem Ende der Oxidation der intrazellulären Schwefelkugeln nahm die Proteinkonzentration der Kultur nur noch geringfügig zu, was ebenfalls zeigt, dass *Alc. vinosum* den zugesetzten Schwefel nicht weiter verwertete. Die XANES Analyse der verbliebenen Schwefelplättchen ergab, dass sie nahezu vollständig ($\sim 95\%$) aus S_8 -Ringen bestanden (Abbildung 25a, Tabelle 14). Der Polymerschwefelanteil betrug nur noch $\sim 3\%$, während er zu Beginn des Versuches bei 68 % gelegen hatte.

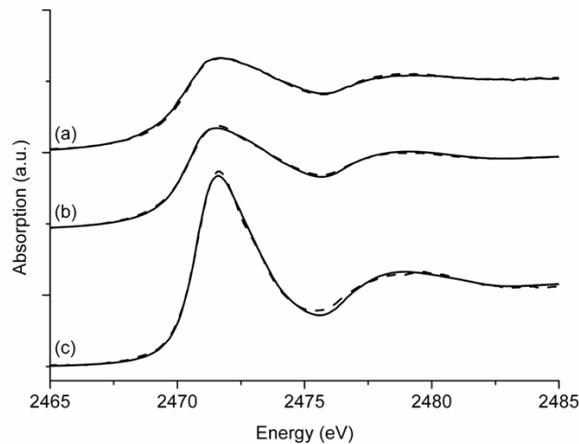


Abbildung 25. Schwefel-K-Kanten-XANES-Spektren (durchgezogene Linien) der in den Kulturen verbliebenen Schwefelplättchen und der aus Elementarschwefel gebildeten Schwefelkugeln und ihre zugehörigen Fits (gestrichelte Linien): (a) Schwefelplättchen bei Wachstum mit Schwefel S1, (b) Schwefelplättchen bei Wachstum mit Schwefel S2 und (c) schwefelkugelhaltige *Alc. vinosum*-Zellen nach der Aufnahme von Elementarschwefel. a.u.: arbitrary units.

In weiteren Wachstumsversuchen wurde *Alc. vinosum* mit 50 mM S2 gefüttert, der einen niedrigeren Polymerschwefelanteil als S1 aufwies. Die Dispersion von S2, die Bildung von Schwefelkugeln, die Entstehung von Schwefelplättchen und der Zeitpunkt, an dem erstes Sulfat gebildet wurde, verliefen vergleichbar zum ersten Experiment. Wieder blieben Schwefelplättchen, die nicht von *Alc. vinosum* aufgenommen und oxidiert wurden, in der Kulturflüssigkeit zurück. Eine konstante Sulfatkonzentration von 22,6 mM, die 45 % der

Tabelle 14. Ergebnisse der Fittens der Schwefel-K-Kanten-XANES-Spektren von Schwefel S1, Schwefel S2 und den verbleibenden Schwefelplättchen an die Summe ihrer Referenzspektren.

Probe	Prozentuale Beiträge der Schwefelspezies*	
	<i>cyclo</i> -Octaschwefel	Polymerschwefel
S1 (zugegeben)	30	68
S1 (verblieben)	95	3
S2 (zugegeben)	62	39
S2 (verblieben)	84	12

Probe	Prozentuale Beiträge der Schwefelspezies*				
	Glutathion (reduziert)	Glutathion (oxidiert)	<i>cyclo</i> -Octaschwefel	Polymer-schwefel	Zinksulfat
<i>Alc. vinosum</i> -Zellen mit Schwefelkugeln nach der Aufnahme von S1	8	15	---	78	---

* verschiedene Schwefelspezies und ihre prozentualen Beiträge zur Schwefelspeziation; Fehler: $< \pm 10\%$; ---: Beitrag $< 1\%$;

erwarteten Konzentration entspricht, wurde über 153 h hinweg bestimmt. Berücksichtigte man wiederum den Fehler der quantitativen Analyse der XANES Spektren entsprach dieser Wert dem Polymerschwefelanteil des zugegebenen Elementarschwefels von 39 %. Die verbliebenen Schwefelplättchen bestanden wie im Versuch mit S1 nahezu vollständig aus S_8 -Ringen (Tabelle 14; zugehöriges Spektrum siehe Abbildung 25b).

Beide Versuche gaben deutliche Hinweise darauf, dass *Alc. vinosum* nur Polymerschwefel verwerten kann - oder diese Schwefelspeziation zumindest stark bevorzugt - wenn Elementarschwefel als Elektronendonator genutzt wird. Um diese Beobachtung weiter zu untermauern, wurde *Alc. vinosum* in einem weiteren Versuch mit 50 mM reinem Polymerschwefel als einziger Schwefelquelle angezogen. Da nur sehr geringe Mengen reinen Polymerschwefels zur Verfügung standen, wurden diese Versuche in gerührten 100 mL Kulturflaschen statt im Fermenter durchgeführt und aufgrund des geringen Volumens auf die Entnahme von Proben während des Versuchsverlaufs verzichtet (mit Ausnahme von Proben für die mikroskopische Untersuchung). Nur die Sulfatendwerte wurden bestimmt. *Alc. vinosum* nahm den zugegebenen Elementarschwefel vollständig auf, bildete intrazelläre Schwefelkugeln daraus und oxidierte diese zu 49 mM Sulfat weiter. Schwefelplättchen wurden nicht gebildet. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass *Alc. vinosum* die Polymerschwefelfraktion des Elementarschwefels präferiert.

In einem weiteren Schritt wurde die Speziation der Schwefelkugeln des auf Elementarschwefel gewachsenen *Alc. vinosum* mit der Speziation der Schwefelablagerungen der mit Sulfid gewachsenen Zellen verglichen. Dafür wurden schwefelkugelhaltige

Alc. vinosum-Zellen mit Hilfe von XANES-Spektroskopie untersucht (Abbildung 25c). Das Fitten der Spektren mit den fünf Referenzsubstanzen reduziertes und oxidiertes Glutathion, *cyclo*-Oktaschwefel, Polymerschwefel und Zinksulfat (Tabelle 14; Spektren der Referenzen siehe Abbildung 6) ergab eine Schwefelspeziation, die der für Schwefelkugeln der auf Sulfid gewachsenen *Alc. vinosum*-Zellen sehr ähnlich ist (Prange *et al.*, 2002a). Nur das Monosulfan:Disulfan- Verhältnis wich leicht von einander ab, was aber auf physiologische Varianzen zurück geführt werden kann (vgl. Prange *et al.*, 2002a).

2.1.2.2 *Thiocapsa roseopersicina*

Tca. roseopersicina, ein weiterer Vertreter der *Chromatiaceae*, wurde ebenfalls mit 50 mM Elementarschwefel S1 als alleinigem Elektronendonator kultiviert. Auch *Tca. roseopersicina* bildete intrazelluläre Schwefelkugeln aus dem extrazellulär zugegebenen Elementarschwefel. Erste Schwefelkugeln konnten 12 h nach der Zugabe des Elementarschwefels zur Kultur beobachtet werden, ihr Abbau und die weitere Oxidation zu Sulfat begann 21 h später (Tabelle 15). Zweihundertundvierzig Stunden nach der Zugabe von Ele-

Tabelle 15. Sulfatbestimmung und lichtmikroskopische Beobachtung der Schwefelkugelbildung in Kulturen, die mit 50 mM Elementarschwefel gefüttert wurden. Die %-Angaben in Klammern geben die relative Menge an Schwefel bezogen auf die erwarteten 50 mM, die als Sulfat wieder gefunden wurde, an.

	Zeit [h]								
<i>Thiocapsa roseopersicina</i>									
	0	3	12	33	72	124	192	240	263
Sulfat [mM]	0,0 (0%)	0,0 (0%)	0,0 (0%)	1,7 (3%)	6,9 (14%)	29,2 (58%)	25,3 (51%)	34,6 (69%)	34,5 (69%)
Schwefelkugeln	---*	---*	ja	ja	ja	ja	ja	---*	---*
<i>Halorhodospira halophila</i>									
	0	3	12	48	72	120	216	312	408
Sulfat [mM]	0,0 (0%)	0,0 (0%)	1,8 (4%)	2,6 (5%)	3,4 (7%)	4,2 (8%)	5,2 (10%)	10,9 (22%)	12,7 (25%)
Schwefelkugeln	---*	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
<i>Halorhodospira abdelmalekii</i>									
	0	3	6	48	72	100	144	168	240
Sulfat [mM]	0,0 (0%)	0,0 (0%)	0,0 (0%)	0,0 (0%)	0,0 (0%)	0,0 (0%)	0,0 (0%)	0,0 (0%)	0,0 (0%)
Schwefelkugeln	---*	---*	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja

* Schwefelkugeln wurden nicht beobachtet

Tabelle 16. Proteinbestimmung verschiedener mit 50 mM Elementarschwefel gefütterter Kulturen.

	Zeit [h]								
<i>Thiocapsa roseopersicina</i>									
	0	3	12	33	72	124	192	240	263
Protein- konzentration [mg/ mL]	0,029	0,066	0,053	0,077	0,113	0,140	0,194	0,209	0,204
<i>Halorhodospira halophila</i>									
	0	3	12	48	72	120	216	312	408
Protein- konzentration [mg/ mL]	0,016	0,030	0,048	0,255	0,228	0,243	0,293	0,293	0,223
<i>Halorhodospira abdelmalekii</i>									
	0	3	6	48	72	100	144	168	240
Protein- konzentration [mg/ mL]	0,098	0,135	0,113	0,499	0,503	0,524	0,437	0,539	0,588

mentarschwefel erreichte die Sulfatkonzentration einen Wert von 34,6 mM, der für weitere 23 h konstant blieb. Dieser Wert entsprach 69 % der bei vollständiger Aufnahme und Oxidation erwarteten Sulfatkonzentration von 50 mM und war damit nahezu identisch mit dem 68 %igen Polymerschwefelanteil im zugegebenen Elementarschwefel, was darauf hindeutete, dass auch *Tca. roseopersicina* Polymerschwefel bevorzugt nutzte. Ein Anstieg der

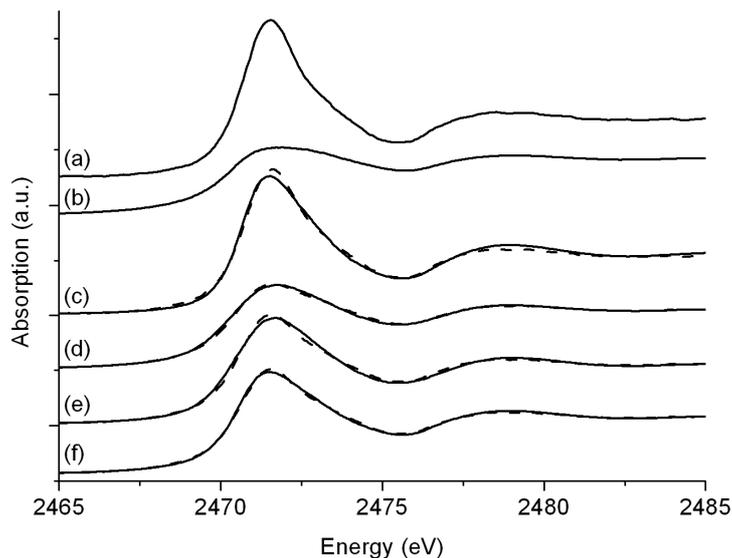


Abbildung 26. Schwefel-K-Kanten-XANES-Spektren (durchgezogene Linien) der Referenzsubstanzen, die für das Fitten der Spektren genutzt wurden: Polymerschwefel (a), *cyclo*-Oktaschwefel (b), des für die Wachstumsexperimente eingesetzten Schwefels S1 (c), der verbleibenden Schwefelplättchen in den Kulturen von *Tca. roseopersicina* (d), *Hlr. halophila* (e) und *Hlr. abdelmalekii* (f) und die zugehörigen Fits (gestrichelte Linien). a.u.: arbitrary units.

Proteinkonzentration der Kultur von 0,029 auf 0,204 mg mL⁻¹ zeigte ein Wachstum mit Elementarschwefel als Elektronendonator an (Tabelle 16). Wie bei *Alc. vinosum* konnte die Bildung kleiner Schwefelplättchen beobachtet werden, die auch nach 263 h nicht in die Zellen aufgenommen und anschließend zu Sulfat oxidiert wurden. Diese Schwefelplättchen wurden mittels Zentrifugation von der Kultur getrennt und mit Hilfe von XANES-Spektroskopie und anschließendem Fitten der Spektren auf ihre Schwefelspeziation hin untersucht. Zu den Spektren der Schwefelplättchen trug hauptsächlich *cyclo*-Oktaschwefel bei (Abbildung 26d, Tabelle 17), was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass *Tca. roseopersicina* genauso wie *Alc. vinosum* ausschließlich Polymerschwefelketten verwerten kann - oder sie zumindest stark bevorzugt nutzt.

Tabelle 17. Ergebnisse des Fittens der Schwefel-K-Kantenspektren an die Summe der Referenzspektren des zugebenen Schwefels und der verbliebenen Schwefelplättchen in verschiedenen Kulturen.

Probe	Prozentualer Beitrag der Schwefelspezie*	
	<i>cyclo</i> -octaschwefel	Polymerschwefel
zugegebener Schwefel	30	68
<i>Thiocapsa roseopersicina</i> verbliebener Schwefel	84	16
<i>Halorhodospira halophila</i> verbliebener Schwefel	59	41
<i>Halorhodospira abdelmalekii</i> verbliebener Schwefel	58	42

* verschiedene Schwefelspezies und ihr prozentualer Anteil an der Schwefelspeziation; Fehler: < ± 10%

2.1.3 Einfluss der Schwefelspeziation auf die Elementarschwefelverwertung durch *Ectothiorhodospiraceae*

Zusätzlich zu den *Chromatiaceae* wurden auch zwei Vertreter der *Ectothiorhodospiraceae* - *Hlr. halophila* und *Hlr. abdelmalekii* - untersucht.

2.1.3.1 *Halorhodospira halophila*

Wurde *Hlr. halophila* mit 50 mM Elementarschwefel S1 im Medium kultiviert, konnte unter dem Mikroskop nach 3 h die Bildung extrazellulärer Schwefelkugeln beobachtet werden. Diese konnten durch ihr charakteristisches Aussehen und die gleichmäßige Form gut von dem zugegebenen Schwefel unterschieden werden, der die Zellen umgab. Ihr Abbau, verbunden

mit der Bildung von Sulfat, begann 9 h später. Die weitere Bildung von Sulfat erfolgte sehr langsam. 408 h nach der Zugabe von Elementarschwefel erreichte die Sulfatkonzentration einen Wert von nur 12,7 mM und unter dem Mikroskop waren noch immer Schwefelkugeln zu erkennen, aber es erfolgte keine weitere Oxidation der Kugeln zu Sulfat mehr. 12,7 mM Sulfat entsprachen 25 % der bei vollständiger Elementarschwefelnutzung erwarteten 50 mM und die relative Sulfatkonzentration war damit deutlich niedriger als der Polymerschwefelanteil des zugegebenen Elementarschwefels S1. Allerdings kam es auch bei Wachstum von *Hlr. halophila* mit S⁰ nach 12 h zur Bildung von Schwefelplättchen. Diese wurden wieder durch Zentrifugation von der Kultur abgetrennt und mittels XANES-Spektroskopie untersucht (Abbildung 26e). Das Fitten der Spektren zeigte, wie die niedrige Sulfatkonzentration nach 408 h vermuten ließ, einen *cyclo*-Oktaschwefelanteil von 59 % und einen noch immer relativ hohen Polymerschwefelanteil von 41 % (Tabelle 17). Trotzdem lag dieser damit deutlich niedriger als der ursprüngliche Anteil von 68 %, was zeigte, dass auch *Hlr. halophila* die Polymerschwefelfraktion des Elementarschwefels zumindest bevorzugte.

2.1.3.2 *Halorhodospira abdelmalekii*

Für den zweiten untersuchten Vertreter der *Ectothiorhodospiraceae*, *Hlr. abdelmalekii*, ergab sich bei Wachstum mit 50 mM Elementarschwefel S1 ein ähnliches Bild. *Hlr. abdelmalekii* begann 6 h nach der Zugabe den Elementarschwefel in extrazelluläre Schwefelkugeln umzuwandeln. Allerdings wurden diese innerhalb der nächsten 234 h nicht wieder abgebaut und zu Sulfat oxidiert. Dies entspricht den Beobachtungen von Then und Trüper (1983), die in ihren Wachstumsexperimenten mit Sulfid keine Bildung von Sulfat beobachten konnten. Auch in dieser Kultur bildeten sich Schwefelplättchen, die wieder mittels XANES-Spektroskopie untersucht wurden (Abbildung 26f). Die Fitergebnisse zeigten, dass *cyclo*-Oktaschwefel mit 58 % und Polymerschwefel mit 42 % zum Spektrum beiträgt (Tabelle 17). Somit war auch hier eine Abnahme des Polymerschwefelanteils im verbliebenen Schwefel im Vergleich zum zugegebenen Schwefel zu beobachten.

2.2 Nachweis löslicher Intermediate bei der Schwefelaufnahme in *Alc. vinosum*

2.2.1 Nachweis mittels HPLC detektierbarer Schwefelverbindungen durch XANES-Spektroskopie

In Wachstumsversuchen mit reduzierten Schwefelverbindungen werden die wichtigsten Schwefelverbindungen Sulfid, Thiosulfat, Polysulfide, Sulfit und Sulfat mittels HPLC nachgewiesen, wobei die verwendeten Methoden für die jeweiligen Verbindungen - Fluoreszenzmarkierung mit Monobromobimane und anschließende Reverse Phasechromatographie für Sulfid, Thiosulfat, Polysulfide und Sulfit bzw. Anionenaustauschchromatographie für Sulfat - nach Rethmeier *et al.* (1997) Nachweisgrenzen von 5 μM für Sulfid, 1 μM für Thiosulfat, 5 μM für Sulfit und 5 μM für Sulfat haben. Die von den Autoren angegebenen Nachweisgrenzen für Sulfid, Thiosulfat und Sulfit können mit der in dieser Arbeit verwendeten Geräte- und Säulenausstattung ebenfalls erreicht werden, die Nachweisgrenze für Sulfat liegt dagegen nur bei etwa 100 μM . Eine Quantifizierung von Polysulfiden war auf Grund fehlender Standards nicht möglich, allerdings wurde die Peakposition in den HPLC-Chromatogrammen zweier in *Alc. vinosum* vorkommender Polysulfide in einer früheren Arbeit identifiziert, deren Ergebnisse kürzlich veröffentlicht wurden (Franz *et al.*, 2009). Zusätzlich zu dieser absoluten Quantifizierungsmöglichkeit bestimmter Schwefelverbindungen sollte nun XANES-Spektroskopie als ergänzende Methode genutzt werden, um Hinweise auf noch unbekannte Schwefelverbindungen, die besonders in der Aufnahme von Elementarschwefel eine Rolle spielen könnten, zu bekommen. Zudem können bei geeigneten Parametern und instrumenteller Ausstattung der Beamline im Fluoreszenzmodus verwertbare Messungen an Konzentrationen im sub-ppm-Bereich durchgeführt werden, was eine sensitivere Detektion ermöglicht, als dies mit HPLC-Methoden möglich ist (Prange & Modrow, 2002). Um die Eignung von XANES-Spektroskopie zur Untersuchung von Kulturüberständen zu prüfen, wurden in einem ersten Versuch die Kulturüberstände der Mutante *Alc. vinosum* ΔsoxY bei Wachstum auf Sulfid analysiert. *Alc. vinosum* ΔsoxY war hierfür besonders geeignet, da die Mutante wie weiter vorne bereits beschrieben bei Wachstum mit Sulfid als Elektronendonator während des Abbaus der intrazellulären Schwefelkugeln Sulfit ins Medium ausscheidet (Hensen, 2006). Zudem lagen während des Abbaus von Sulfid auch niedrige Konzentrationen von Thiosulfat vor, die auf Grund der Deletion von *soxY* nicht weiter abgebaut werden

konnten. Somit handelte es sich bei den Überständen von Kulturen der Mutante *ΔsoxY* um Probenmaterial, das mit Sulfid, Thiosulfat, Sulfit und Sulfat alle Schwefelverbindungen enthielt, die sich mittels HPLC detektieren und quantifizieren lassen und somit einen qualitativen Vergleich zwischen beiden Methoden zuließ. Abbildung 27 zeigt einen typischen Verlauf der Konzentrationen von Sulfid, Thiosulfat, Sulfit, intrazellulärem Schwefel und Sulfat während des Wachstums von *Alc. vinosum ΔsoxY* mit 2 mM Sulfid, bestimmt mittels HPLC. Innerhalb der ersten 7 h wurde Sulfid vollständig oxidiert und in intrazelluläre Schwefelkugeln umgewandelt. Auf die Abbildung der Polysulfide, die als Intermediate dieses Schrittes auftreten (Prange *et al.*, 2004), wurde zu Gunsten einer übersichtlicheren Darstellung verzichtet. Nachdem Sulfid vollständig verbraucht war, begann die Oxidation des gespeicherten Schwefels. Auf Grund der stark reduzierten Sulfitoxidationsrate der Mutante *Alc. vinosum ΔsoxY* wurde eine Stunde nach dem Beginn des Schwefelkugelabbaus Sulfit ins Medium ausgeschieden. Es sammelten sich bis zu 0,6 mM Sulfit im Medium an. War der intrazelluläre Schwefel annähernd vollständig oxidiert, wurde das Sulfit wieder in die Zelle aufgenommen und zum Endprodukt Sulfat oxidiert. Während der Oxidation von Sulfid zu intrazellulärem Schwefel wurden zudem bis zu 0,4 mM Thiosulfat im Medium detektiert, die nicht weiter verwertet wurden.

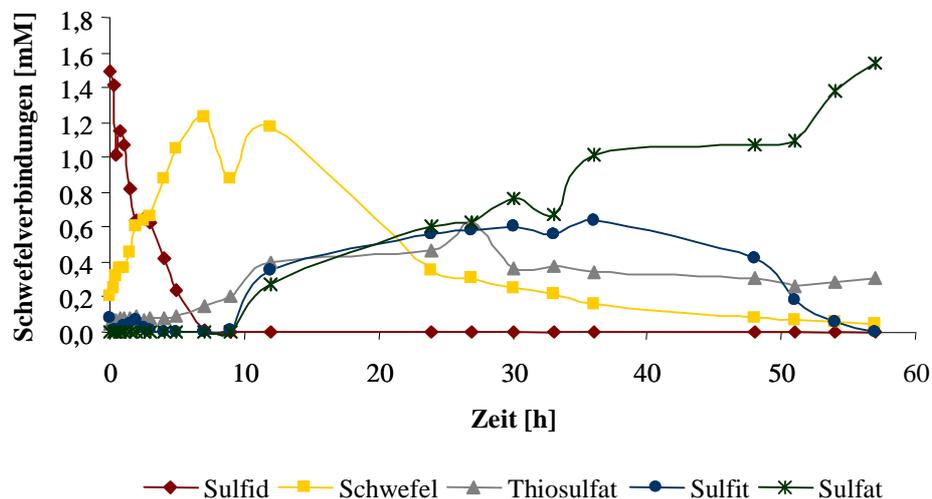


Abbildung 27. Umsatz von Schwefelverbindungen durch *Alc. vinosum ΔsoxY* während photolithoautotrophen Wachstums mit 2 mM Sulfid. Die Proteinkonzentrationen lagen zwischen 80 und 120 mg mL⁻¹.

Von den Kulturüberständen der Mutante *Alc. vinosum ΔsoxY* wurden zusätzlich XANES-Spektren aufgenommen, wobei die beschriebenen HPLC-Messungen als interne Kontrolle

dienten. Der Kulturüberstand wurde vor dem Ausscheiden von Sulfid ins Medium (3 h nach Zugabe von Sulfid), während des Vorliegens von Sulfid im Medium (27 h nach der Zugabe von Sulfid) und nach der vollständigen Oxidation von Sulfid zu Sulfat (58 h nach der Zugabe von Sulfid) untersucht. Abbildung 28a zeigt die Spektren an der Schwefel-K-Kante, die für die Überstände erhalten wurden. In Tabelle 18 sind die Ergebnisse des Fittens der Spektren mit Hilfe von WINXAS zu sehen. Die Spektren der Referenzsubstanzen, die zum Fitten der Überstandsspektren verwendet wurden, sind in Abbildung 6 dargestellt. In allen Kulturüberständen korrelierten die prozentualen Beiträge von Sulfid, Thiosulfat und Sulfat mit den entsprechenden mittels HPLC bestimmten Konzentrationen. 3 h nach der Sulfidzugabe waren nur Spuren von Sulfid im Überstand nachweisbar, während Sulfid in der Probe, die nach 27 h genommen wurde, 56 % der vorhandenen Schwefelkomponenten ausmachte. Sulfid führte zu einer typischen, auffallenden Struktur bei einer Energie von 2477,3 eV (Abbildung 28a, Spektrum b). Nach 58 h wurde Sulfid nahezu vollständig zu Sulfat weiter oxidiert, was sich auch im XANES-Spektrum zeigte: Nur noch Spuren von Sulfid waren nachweisbar und die Struktur bei 2477,3 eV fehlte nahezu vollständig im Spektrum dieses Überstandes (Abbildung 28a, Spektrum c). Auch die Bildung und die unterbundene Verwertung von Thiosulfat zeigte sich in den Spektren, da Thiosulfat signifikant zu allen Überstandsspektren beitrug. Der prozentuale Beitrag von Sulfat nahm während der 58 h als ein Resultat der vollständigen Oxidation der intrazellulären Schwefelkugeln zu diesem Endprodukt zu und nach 58 h war das Sulfatmaximum bei 2481,4 eV das dominante spektrale Merkmal (Abbildung 28a, Spektrum c). Allerdings trug auch zum Fitten des nach 3 h erhaltenen Spektrums Sulfat bei, obwohl zu diesem Zeitpunkt noch keine Oxidation des intrazellulär gespeicherten Schwefels stattgefunden hatte. Dabei handelte es sich um mikromolare Mengen Sulfat, die aus der eisensulfathaltigen Spurenelementlösung, die für das Medium verwendet wurde, stammten. Diese niedrigen Konzentrationen lagen unter dem Detektionslimit der HPLC-Methode, die zum Nachweis von Sulfat verwendet wurde. Trotzdem führten sie zu einem auffälligen lokalen Maximum im XANES-Spektrum, was die Sensitivität der Methode zeigte.

Während sich die prozentualen Beiträge von Sulfid, Thiosulfat und Sulfat zu den XANES-Spektren im Einklang mit den HPLC-Ergebnissen befanden, war Sulfid in den XANES-Spektren nicht zu sehen, obwohl es 3 h nach der Zugabe laut HPLC-Messungen in einer Konzentration von 0,6 mM im Medium vorlag. Da die Probenaufarbeitung unter oxidischen Bedingungen stattfand, sollte ausgeschlossen werden, dass Sulfid durch eine Umwandlung in höher oxidierte Verbindungen verloren ging. Daher wurde der Wachstumsversuch ein wei-

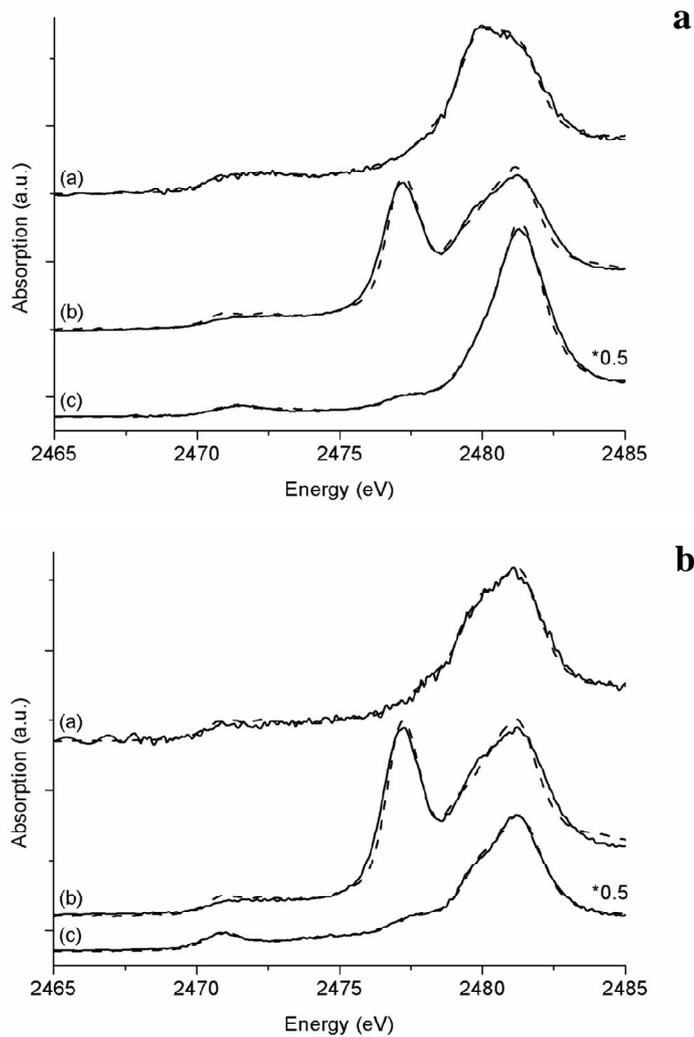


Abbildung 28. Schwefel-K-Kanten-XANES-Spektren (durchgezogene Linien) der Überstände von *Alc. vinosum* Δ soxY-Kulturen vor (a) und während (b) des Ausscheidens von Sulfit und nach der vollständigen Oxidation von Sulfit (c) und die zugehörigen Fits (gestrichelte Linien). Die Proben wurden unter oxischen (a) und anoxischen Bedingungen (b) präpariert. a.u.: arbitrary units.

teres Mal durchgeführt, wobei diesmal Entnahme und Aufarbeitung der Proben und die anschließende Messung unter anoxischen Bedingungen (d.h. unter Stickstoffatmosphäre) stattfand. Allerdings fanden sich die selben Schwefelverbindungen mit leichten Abweichungen in den prozentualen Beiträgen der einzelnen Spezies auch in den unter anoxischen Bedingungen präparierten Überständen (Tabelle 18; Spektren siehe Abbildung 28b). Sulfid fehlte auch in diesen Proben, so dass seine chemische Oxidation ausgeschlossen werden konnte. Allerdings stellte die fehlende Nachweisbarkeit von offensichtlich in den Kulturen vorhandenem Sulfid natürlich eine gewisse Limitierung der XANES-Spektroskopie an sulfidhaltigen Überständen dar.

Allerdings reflektierten die Fitergebnisse der XANES-Spektren für Thiosulfat, Sulfit und Sul-

Tabelle 18. Ergebnisse des Fittens der Schwefel-K-Kanten-XANES-Spektren der Kulturüberstände an die Summe ihrer Referenzspektren.

Referenz- substanzen (Schwefelspezies)	Prozentuale Beiträge der Schwefelspezies*					
	nach 3h		nach 27 h		nach 58 h	
	oxisch ^a	anoxisch ^a	oxisch ^a	anoxisch ^a	oxisch ^a	anoxisch ^a
Natriumthiosulfat (S ₂ O ₃ ²⁻)	21	27	18	19	13	39
Natriumsulfit (SO ₃ ²⁻)	3	4	56	58	7	8
Zinksulfat (SO ₄ ²⁻)	14	21	13	13	48	27
Glutathion (ox.) (C-S-S-C)	---	---	---	---	9	6
Glutathion (red.) (C-S-H)	9	9	6	5	---	---
Methioninsulfon (C-SO ₂ -C)	10	11	---	---	---	---
Cysteinsäure (C-SO ₃ ⁻)	43	29	7	6	21	20

^a Bedingungen während der Probenpräparation

* verschiedene Schwefelspezies und ihr prozentualer Beitrag zu Schwefelspeziation; Fehler: < ± 10%; --- = Beitrag < 2 %;

fat nicht nur die mittels HPLC gemessene Entwicklung der Konzentrationen, sondern stimmten auch mit den sich aus den HPLC-Ergebnissen ergebenden molaren Konzentrationsverhältnissen dieser Schwefelverbindungen überein. Da einige Schwefelspezies in den Überständen vorhanden waren, die mittels HPLC nicht detektierbar und/ oder quantifizierbar waren, aber zu charakteristischen Absorptionen in den XANES-Spektren führten (siehe unten), konnte die Schwefelgesamtbilanz (Summe der molaren Konzentrationen entspricht 100 %), die sich aus den HPLC-Ergebnissen ergibt, nicht für die direkte Berechnung der molaren Konzentrationen aus den prozentualen Beiträgen der einzelnen Schwefelspezies zu den XANES-Spektren verwendet werden. Daher wurde eine indirekte Berechnung der Konzentrationen versucht: Für alle drei Überstände wurde die per HPLC bestimmte Thiosulfatkonzentration als ein Fixpunkt verwendet und äquivalent zu ihrem entsprechenden prozentualen Beitrag zum Fitten des Spektrums gesetzt. Anschließend wurden - sozusagen in umgekehrter Richtung - die molaren Konzentrationen für Sulfit und Sulfat aus deren prozentualen Beiträgen zum Fitten der Spektren berechnet und mit den per HPLC gemessenen Werten verglichen. Tabelle 19 zeigt, dass alle auf diese Art erhaltenen Konzentrationen den per HPLC gemessenen Werten ähnlich waren. Die Abweichungen lagen zwischen 2 µM für Sulfit nach 3 h und Sulfat nach 27 h und 122 µM für Sulfat nach 58 h.

Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, dass sich XANES-Spektroskopie gut zur Ergänzung und Erweiterung der bisher genutzten HPLC-Methoden eignete.

Tabelle 19. Molare Konzentrationen verschiedener Schwefelverbindungen in den Kulturüberständen. Die Werte wurden aus den prozentualen Beiträgen der Spezies zum Fitten der XANES-Spektren berechnet und mit den mittels HPLC gemessenen Konzentrationen verglichen.

Schwefelspezies	Konzentrationen der Schwefelverbindungen [mM]					
	nach 3 h		nach 27 h		nach 58 h	
	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet	gemessen	berechnet
$S_2O_3^{2-}$	0,079	0,079 ^a	0,198	0,198 ^a	0,263	0,263 ^a
SO_3^{2-}	0,013	0,011	0,586	0,616	0,186	0,142
SO_4^{2-}	0,040 ^b	0,052	0,145	0,143	1,093	0,971

^a die gemessenen molaren Thiosulfatkonzentrationen wurden dem prozentualen Beitrag von Thiosulfat, der durch das Fitten des Spektrums erhalten wurde, gleichgesetzt

^b Konzentration von $FeSO_4 \times 7 H_2O$ im Medium; die Konzentration liegt unter dem Detektionslimit der HPLC und konnte deshalb nicht gemessen werden

2.2.2 Nachweis weiterer Schwefelspezies

Neben den auch mittels HPLC detektierbaren Schwefelverbindungen trugen auch C-S-S-C, C-S-H, C-SO₂-C und C-SO₃⁻-Spezies signifikant zu den XANES-Spektren der Überstände bei (Tabelle 19). Ihre prozentualen Beiträge und somit auch ihre Konzentrationen in den Überständen waren relativ niedrig und überstiegen mit einer Ausnahme nicht die 10 %. Nur C-SO₃⁻ war in den vor und nach der Ausscheidung von Sulfid untersuchten Überständen in höheren Konzentrationen vorhanden (jeweils 43 und 21 %). Es kann ausgeschlossen werden, dass diese oxidierten Schwefelverbindungen durch Oxidation von organischen Schwefelverbindungen durch atmosphärischen Sauerstoff statt durch zelluläre Aktivität entstanden sind, da sich die selben Schwefelspezies mit nur geringen Abweichungen in den prozentualen Beiträgen auch in den unter anoxischen Bedingungen präparierten Überständen finden (Tabelle 19). Dass solche Schwefelspezies, die mit Hilfe der HPLC-Methoden nicht identifiziert werden konnten, in den *Alc. vinosum* $\Delta soxY$ - Kulturüberständen nachgewiesen werden konnten, zeigte, dass sich XANES Spektroskopie tatsächlich als Ergänzung und Erweiterung der bisher verwendeten Analysemethoden für Schwefelverbindungen eignete.

2.2.3 Untersuchung der Überstände von *Alc. vinosum*-Kulturen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Nachdem XANES-Spektroskopie sich als geeignet für die Untersuchung von Kulturüberständen erwiesen hatte, wurden mit dieser Methode Überstände von *Alc. vinosum* Kulturen, die mit 50 mM Elementarschwefel, 2 mM Sulfid oder 2 mM Thiosulfat als jeweiligen Elektronendonator gewachsen waren, untersucht und miteinander verglichen. Abbildung 29 zeigt den Verlauf der mittels HPLC bestimmten Sulfid-, Thiosulfat-, intrazellulären Schwefel- und Sulfatkonzentrationen in den jeweiligen Kulturen. Für die mit Elementarschwefel gewachsene Kultur konnten nur die Werte für Sulfat dargestellt werden (Abbildung 29a), da es - wie weiter oben bereits erwähnt - nicht möglich war, den extrazellulären, zugegebenen Schwefel von den schwefelkugelhaltigen Zellen zu trennen. Allerdings war auch in dieser Kultur unter dem Mikroskop die Bildung von Schwefelkugeln aus dem zugegebenen Elementarschwefel nach 3 h zu beobachten. Nach 12 h begann deren Abbau und die Bildung von Sulfat. Weitere Schwefelverbindungen wie Sulfid oder Thiosulfat, die möglicherweise wasserlösliche Mobilisierungsprodukte des Elementarschwefels darstellen könnten, wurden nicht gefunden.

Wurden 2 mM Sulfid als Elektronendonator zugefügt, wurde es innerhalb der ersten 3 h vollständig oxidiert und in intrazelluläre Schwefelkugeln umgewandelt (Abbildung 29b). Auf die Darstellung der Polysulfide, die ein Zwischenprodukt der Sulfidoxidation sind, wurde der Übersichtlichkeit halber wieder verzichtet. Auch hier waren kleine Mengen Thiosulfat während der Sulfidoxidation zu beobachten (bis zu 0,15 mM). Die Oxidation des gespeicherten Schwefels und die entsprechende Bildung von Sulfat begannen, sobald Sulfid vollständig verbraucht war.

Wurde *Alc. vinosum* mit 2 mM Thiosulfat angezogen, wurde dieses innerhalb von 12 h verbraucht (Abbildung 29c). Nur der Sulfanschwefel des Thiosulfat wird auf die Schwefelkugeln übertragen, während der Sulfonschwefel sofort zu Sulfat oxidiert wird (Hensen *et al.*, 2006). In dem in Abbildung 29c gezeigten Versuch wurden 2,2 mM Schwefel in der Zelle abgelagert und gleichzeitig 2,4 mM Sulfat gebildet. Später wurde auch der gespeicherte Schwefel vollständig oxidiert, was zu einer Sulfatendkonzentration von 4,11 mM führte.

Aus den gezeigten Kulturen wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten Überstandsproben entnommen, mittels XANES-Spektroskopie untersucht und die erhaltenen Spektren unter Verwendung geeigneter Referenzsubstanzen quantitativ analysiert. Die Abbildungen 30, 31

C Ergebnisse

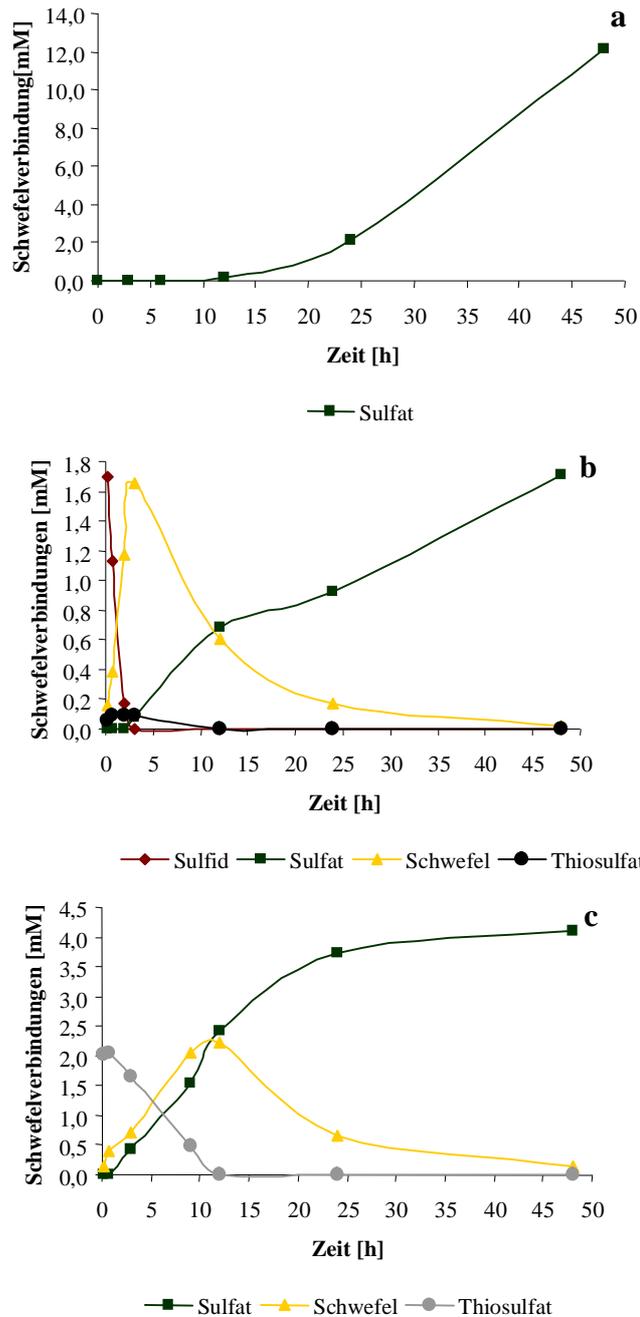


Abbildung 29. Umsatz von Schwefelverbindungen durch *Alc. vinosum* während photolithoautotrophen Wachstums auf 50 mM Elementarschwefel (a), 2 mM Sulfid (b) und 2 mM Thiosulfat (c). Die Proteinkonzentrationen lagen zwischen 80 und 120 mg mL⁻¹.

und 32 zeigen die Spektren der verschiedenen Kulturen und Tabelle 20 gibt eine Übersicht über die entsprechenden Filtergebnisse. Die Spektren der Referenzsubstanzen sind in Abbildung 6 zu sehen. Die Überstandsprouben wurden aus den mit Sulfid und Thiosulfat angezogenen Kulturen nach 15 min, 45 min, 3 h und 48 h genommen, die aus den mit Elementarschwefel angezogenen nach 15 min, 3 h, 12 h und 48 h, da die Aufnahme des Schwefels nicht vor 3 h begann (siehe oben). Für alle Kulturüberstände zeigte sich, dass die

prozentualen Beiträge für Sulfat in Einklang mit den mittels HPLC bestimmten Konzentrationen standen. Nach 48 h wurde Sulfat von beiden Methoden als die dominierende Schwefelkomponente bestimmt (Abbildungen 29, 30, 31 und 32 und Tabelle 20). Auch der Abbau von Thiosulfat, den die HPLC-Ergebnisse zeigten, wird von den XANES-Messungen wiedergegeben. Wie auch bei den Kulturüberständen der Mutante *Alc. vinosum* Δ soxY wurden die mikromolaren Sulfatkonzentrationen, die unter der Nachweisgrenze der verwendeten HPLC-Methode lagen und aus der Spurenelementlösung im Medium herrührten, in den 15 min-XANES-Spektren sichtbar. Noch mal verdeutlicht wird dieser Umstand durch Spektrum e in Abbildung 30. Es zeigt Nullmedium vor der Inokulation mit *Alc. vinosum*. Wie aus der Abbildung und den zugehörigen Fitergebnissen (Tabelle 20) zu erkennen ist, lagen im Medium bereits Spuren von Sulfat, Thiosulfat, C-S-H-Spezies, Sulfonen und Sulfonaten vor. Die nach 15 min Wachstum auf Elementarschwefel untersuchten Kulturüberstände zeigten relativ hohe prozentuale Beiträge des Sulfat zum Spektrum. Das könnte zu der fälschlichen Annahme führen, dass diese Überstände tatsächlich hohe Sulfatkonzentrationen aufwiesen. Das war nicht der Fall. Die Überstände von Zellen, die mit Elementarschwefel als Elektronendonator wuchsen, wiesen sehr niedrige Gesamtkonzentrationen an Schwefelverbin-

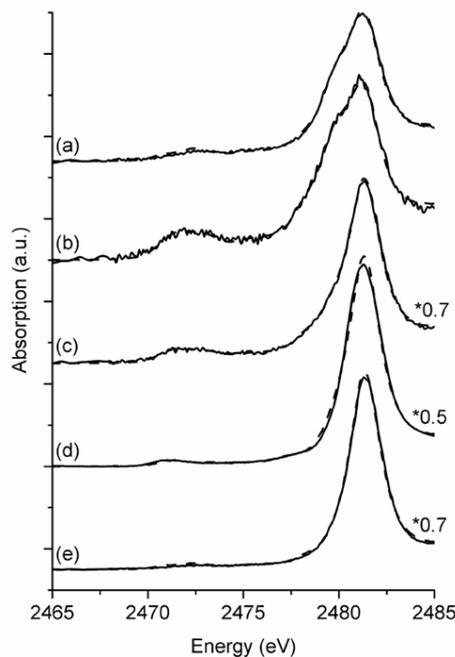


Abbildung 30. Schwefel-K-Kanten-XANES-Spektren (durchgezogene Linien) der Überstände von *Alc. vinosum*-Kulturen bei Wachstum mit 50 mM Elementarschwefel 15 min (a), 3 h (b), 12 (c) und 48 h (d) nach der Zugabe von Elementarschwefel. Spektrum (e) zeigt Nullmedium ohne Zellen. Die zugehörigen Fits sind als gestrichelte Linien dargestellt. a.u.: arbitrary units.

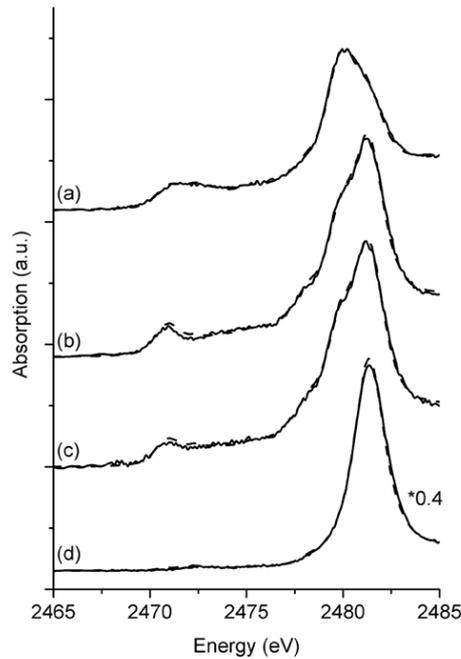


Abbildung 31. Schwefel-K-Kanten-XANES-Spektren (durchgezogene Linien) der Überstände von *Alc. vinosum*-Kulturen bei Wachstum mit 2 mM Sulfid 15 min (a), 45 min (b), 3 h (c) und 48 h (d) nach der Zugabe von Elementarschwefel. Die zugehörigen Fits sind als gestrichelte Linien dargestellt. a.u.: arbitrary units.

dungen auf, was auch die Tatsache zeigte, dass sie mit den für diese Arbeit verwendeten HPLC-Methoden nicht nachweisbar waren. Sulfat stellte in diesem Fall einfach die Hauptkomponente dieser in Spuren vorhandenen Spezies dar, weshalb die eigentlich sehr niedrige Sulfatkonzentration zu einem hohen prozentualen Beitrag zu den Spektren führte. Übereinstimmend damit waren die nach 15 min, 3 h und 12 h aufgenommenen XANES-Spektren im Vergleich zu den anderen gezeigten Spektren auch sehr verrauscht, was an der niedrigen Schwefelkonzentration in den Überständen lag (Abbildungen 30, 31 und 32). Im Gegensatz dazu war das nach 48 h aufgenommene Spektrum annähernd “glatt“, was zu dem deutlichen Anstieg der Sulfatkonzentration passte. Bemerkenswert war, dass laut XANES-Analyse während des Wachstums von *Alc. vinosum* auf Elementarschwefel Thiosulfat entstand, obwohl dieses mit den etablierten HPLC-Methoden mit einer Nachweisgrenze von 1 μM für diese Schwefelverbindung (Rethmeier *et al.*, 1997) nicht nachweisbar war. Eine Mobilisierung des Elementarschwefels zu Thiosulfat konnte allerdings ausgeschlossen werden, da bereits gezeigt wurde, dass die Mutante *Alc. vinosum* ΔsoxY , die nicht mehr zur Nutzung von Thiosulfat in der Lage war (Hensen *et al.*, 2006) weiterhin Elementarschwefel verwerten konnte (Franz, 2005).

Neben Sulfat und Thiosulfat zeigten die XANES-Spektren der Überstände aus den Kulturen

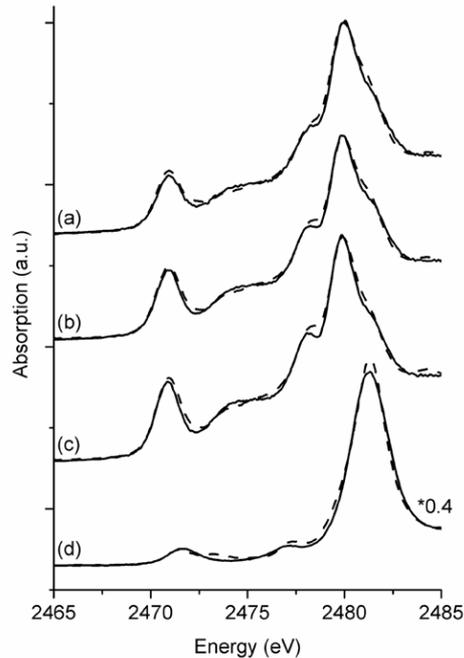


Abbildung 32. Schwefel-K-Kanten-XANES-Spektren (durchgezogene Linien) der Überstände von *Alc. vinosum*-Kulturen bei Wachstum mit 2 mM Thiosulfat 15 min (a), 45 min (b), 3 h (c) und 48 h (d) nach der Zugabe von Elementarschwefel. Die zugehörigen Fits sind als gestrichelte Linien dargestellt. a.u.: arbitrary units.

mit den drei verschiedenen Elektronendonoren deutliche Strukturen bei Energiepositionen von 2471-2475 eV (Abbildungen 30, 31 und 32). Diese wurden von Schwefelspezies mit der Struktur C-S-S-C und/ oder C-S-H verursacht. Keine dieser Verbindungen schien spezifisch für das Wachstum auf Elementarschwefel zu sein, weshalb es wenig wahrscheinlich war, dass eine von ihnen an der Mobilisierung des unlöslichen Substrates beteiligt war. Allerdings zeigten die Entwicklungen der prozentualen Beiträge dieser Verbindungen über die Zeit signifikante Unterschiede, wenn *Alc. vinosum* auf Sulfid, Thiosulfat oder Elementarschwefel wuchs (Tabelle 20). In Kulturen, die auf Sulfid wuchsen, waren nach 45 min, 3 h und 48 h nur Spezies der Struktur C-S-H vorhanden. Wurde Thiosulfat als Elektronendonator genutzt, lagen C-S-H-Spezies nach 15 min, 45 min und 3 h vor, verschwanden aber nach 48 h vollständig. Zu diesem Zeitpunkt wurden C-S-S-C-Spezies gefunden. Es ist bemerkenswert, dass sich das Spektrum dieses Überstandes nicht mit oxidiertem und reduziertem Glutathion als Referenz für C-S-S-C- und C-S-H-Spezies fitten ließ. Stattdessen lieferte das Fitten mit Cystin und Cystein sinnvolle Ergebnisse, was darauf hindeutete, dass Glutathion selbst nicht in den Überständen von *Alc. vinosum* vorhanden war. Während der Aufnahme und der Oxidation von Elementarschwefel trugen sowohl C-S-S-C- als auch C-S-H-Spezies mit wechselnden prozentualen Anteilen zum Spektrum bei.

Neben den oben beschriebenen Strukturen zeigten die XANES-Spektren der zu den ersten drei Zeitpunkten entnommenen Überstände aus den Kulturen mit den drei verschiedenen Elektronendonoren weitere deutliche Strukturen bei Energiepositionen von 2478,5 - 2480,0 eV (Abbildungen 30, 31 und 32, jeweils Spektrum a, b und c). Diese sind charakteristisch für höher oxidierte Schwefelspezies wie Sulfone und Sulfonate (Vairavamurthy *et al.*, 1994). Das Fitten der 48 h-Überstandsspektren zeigte ebenfalls kleine Beiträge von Absorptionen die von Sulfonen und Sulfonaten verursacht werden (Tabelle 20), im Spektrum dominierte allerdings die Struktur von Sulfat bei 2481,4 eV. Methioninsulfon und Cysteinsäure stellten adäquate Referenzsubstanzen für das Fitten der spektralen Strukturen der Sulfone und Sulfonate dar, was auf die Strukturen C-SO₂-C und C-SO₃⁻ hindeutete. Die quantitative Analyse der XANES-Spektren ergab, dass organische Sulfone nur während des Wachstums auf Sulfid und Elementarschwefel in den Überständen vorlagen (Tabelle 20). Ihre prozentualen Beiträge zu den Spektren stiegen im Laufe des Wachstums der Zellen auf diesen Substraten leicht an. Wurde *Alc. vinosum* mit Thiosulfat als Elektronendonor angezogen, konnten keine Sulfone detektiert werden. Im Gegensatz dazu waren organische Sulfonate in allen Kulturüberständen vorhanden (Tabelle 20). Ihre relativen prozentualen Anteile nahmen innerhalb von 48 h stark ab, wenn *Alc. vinosum* mit Sulfid wuchs. Wuchs der Organismus mit Thiosulfat, nahmen sie weniger ab und bei Wachstum mit Elementarschwefel nahmen ihre prozentualen Anteile zuerst ab und anschließend wieder zu. Trotz dieser kleinen Unterschiede schien es auf Grund der Anwesenheit von organischen Sulfonen und Sulfonaten auch unter anderen Wachstumsbedingungen als dem Wachstum auf Elementarschwefel unwahrscheinlich, dass es sich bei diesen Schwefelverbindungen um solche handelte, die für die Mobilisierung des Elementarschwefels verantwortlich waren. Somit konnten weder mittels HPLC noch mit Hilfe der XANES-Spektroskopie an Kulturüberständen eindeutig lösliche Intermediate der Schwefelmobilisierung identifiziert werden. Auch für *Tca. roseopersicina* und *Hlr. halophila* wurden die Kulturüberstände mittels XANES Spektroskopie untersucht, da die Ergebnisse im wesentlichen aber die selben waren wie für *Alc. vinosum* wird auf ihre Darstellung hier verzichtet.

Tabelle 20. Ergebnisse des Fittens der Schwefel-K-Kanten XANES-Spektren von *Alc. vinosum*-Kulturüberständen an die Summe ihrer Referenzspektren.

Referenz- substanz Schwefel spezie	Zeit [h]	Prozentuale Beiträge der Schwefelspezies*							
		Glutathion oxidiert C-S-S-C	Glutathion reduziert C-S-H	Cystein C-S-H	Cystin C-S-S-C	Thiosulfat S ₂ O ₃ ²⁻	Methionin sulfon C-SO ₂ -C	Cystein- säure C-SO ₃ ⁻	Sulfat SO ₄ ²⁻
Elementar- schwefel	3	---	9	n.e.	n.e.	12	8	39	32
	6	11	7	n.e.	n.e.	16	14	30	22
	12	10	5	n.e.	n.e.	12	11	16	47
	48	6	---	n.e.	n.e.	6	---	24	62
Sulfid	0,25	4	10	n.e.	n.e.	28	3	46	9
	0,75	---	7	n.e.	n.e.	39	7	19	26
	3	---	8	n.e.	n.e.	32	9	22	27
Thiosulfat	48	---	5	n.e.	n.e.	6	9	5	75
	0,25	---	7	n.e.	n.e.	65	---	21	5
	0,75	---	5	n.e.	n.e.	79	---	10	5
	3	---	5	n.e.	n.e.	82	---	8	4
	48	n.e.	n.e.	---	14	3	---	24	50

* verschiedene Schwefelspezies und ihr prozentualer Beitrag zur Schwefelspeziation; Fehler: $\pm 10\%$; --- = Beitrag <math>< 2\%</math>; n.e. = nicht einbezogen

2.3 Untersuchungen zum Zell-Schwefelkontakt

Da bei der Aufnahme von Elementarschwefel bisher keine löslichen Intermediate, die eine Mobilisierung des Schwefels in einer gewissen Distanz zu Zelle nahe gelegt hätten, gefunden wurden sollte als nächstes untersucht werden, ob ein direkter Kontakt zwischen Zelle und Schwefel eine Voraussetzung für dessen Aufnahme ist.

2.3.1 Direkter Zell-Schwefelkontakt bei *Alc. vinosum*, *Tca. roseopersicina* und *Hlr. halophila*

Zu diesem Zweck wurde *Alc. vinosum* wieder mit Elementarschwefel S1 als Elektronendonator kultiviert, allerdings wurden Zellen und Schwefel diesmal durch einen Dialyseschlauch mit einem Ausschlussmolekulargewicht von 100 kDa voneinander getrennt. Dabei befand sich der Schwefel im Dialyseschlauch. Dies unterband vollständig die Bildung von Schwefelkugeln (Tabelle 21). Auch Sulfat konnte innerhalb von 84 h nicht detektiert werden (Tabelle 21) und die Proteinkonzentration der Kultur blieb konstant (Tabelle 22).

Tabelle 21. Sulfatbestimmung und lichtmikroskopische Beobachtung der Schwefelkugelbildung in Kulturen, die durch eine Dialysemembran vom Elementarschwefel getrennt wurden.

	Zeit [h]							
<i>Allochromatium vinosum</i>								
	0	3	12	84	114	132	156	267
Sulfat [mM]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Schwefelkugeln	---*	---*	---*	---*	---*	---*	---*	---*
<i>Thiocapsa roseopersicina</i>								
	0	3	6	12	24	48	72	92
Sulfat [mM]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Schwefelkugeln	---*	---*	---*	---*	---*	---*	---*	---*
<i>Halorhodospira halophila</i>								
	0	3	6	12	24	48	72	96
Sulfat [mM]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Schwefelkugeln	---*	---*	---*	---*	---*	---*	---*	---*

* Schwefelkugeln wurden nicht beobachtet

Auch für *Tca. roseopersicina* - ein weiteres Mitglied der *Chromatiaceae* - und *Hlr. halophila* - einen Vertreter der extrazelluläre Schwefelkugeln bildenden *Ectothiorhodospiraceae*- wurde die Notwendigkeit eines direkten Kontaktes zwischen Zelle und Elementarschwefel wie oben beschrieben untersucht. Bei beiden unterband die Trennung zwischen Zellen und Elementarschwefel die Verwertung des Schwefels vollständig. Es konnte

keine Bildung von Schwefelkugeln beobachtet und entsprechend auch kein Sulfat nachgewiesen werden (Tabelle 21) und auch die Proteinkonzentration der Kultur blieb konstant (Tabelle 22). Diese Ergebnisse zeigten, dass ein direkter Zell-Schwefel-Kontakt nicht nur für *Alc. vinosum* für die Schwefelverwertung essentiell war, sondern offensichtlich auch für andere Vertreter sowohl der *Chromatiaceae* als auch der *Ectothiorhodospiraceae*.

Tabelle 22. Proteinbestimmung verschiedener mit Elementarschwefel S1 gefütterter Kulturen, in denen der Schwefel durch eine Dialysemembran von den Zellen getrennt wurde.

	Zeit [h]							
<i>Allochro matium vinosum</i>								
	0	3	6	9	24	36	48	84
Protein- konzentration [mg mL ⁻¹]	0,078	0,078	0,077	0,081	0,088	0,086	0,076	0,074
<i>Thiocapsa roseopersicina</i>								
	0	3	6	12	24	48	72	92
Protein- konzentration [mg mL ⁻¹]	0,013	0,037	0,038	0,025	0,031	0,043	0,025	0,23
<i>Halorhodospira halophila</i>								
	0	3	6	12	24	48	72	96
Protein- konzentration [mg mL ⁻¹]	0,069	0,067	0,076	0,062	0,070	0,047	0,051	0,064

2.3.2 Isolierung der Proteine der äußeren Membran von *Alc. vinosum*

Da offensichtlich ein direkter Zell-Schwefel-Kontakt für die Verwertung von Elementarschwefel notwendig war, wäre es nahe liegend gewesen, dass spezifische Proteine der äußeren Membran an der Aufnahme des Elementarschwefels beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden die Proteine der äußeren Membran von *Alc. vinosum* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen isoliert und miteinander verglichen, wobei zwei verschiedene Methoden zur Isolierung der Proteine der äußeren Membran verwendet wurden.

2.3.2.1 Isolierung nach Hindennach & Hennig (1975)

Zur ersten Isolierung wurde eine leicht modifizierte Form der von Hindennach & Henning (1975) zur Isolierung der Proteine der äußeren Membran von *E. coli* verwendeten Methode genutzt. Nach dem Zellaufschluss und der anschließenden Abtrennung der Membranfraktion

wurden die Membranproteine mit Hilfe von N-Laurylsarkosin solubilisiert. Die Proteine der äußeren Membran ließen sich nicht solubilisieren, so dass sie durch Zentrifugation nun von den gelösten Proteinen der intrazellulären Membranen abgetrennt werden konnten. Abbildung 33a zeigt die isolierten Proteine der äußeren Membran, wobei diese von *Alc. vinosum* Zellen stammten, die mit Malat, Sulfid und Elementarschwefel als Elektronendonator gewachsen waren. Alle Isolierungen zeigten etwa sieben Banden, wobei die charakteristischste leicht

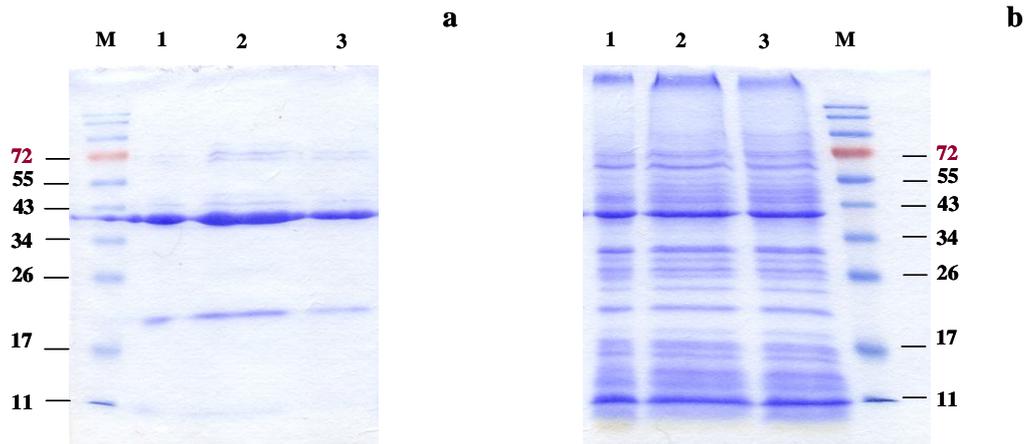


Abbildung 33. Isolierung von Proteinen der äußeren Membran nach Hindennach & Henning (1975) (a) und Shen *et al.* (1989) (b). a und b: Proteinmarker (M), Wachstum von *Alc. vinosum* auf Malat (1), Wachstum von *Alc. vinosum* auf Sulfid (2) und Wachstum von *Alc. vinosum* auf Elementarschwefel (3). Es wurden pro Spur 6 µg Protein auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen.

unterhalb der 43 kDa-Bande des Markers lief. Hierbei handelte es sich vermutlich um das dominierende Protein der äußeren Membran von *Alc. vinosum*, das 42 kDa groß ist und bereits von Lane & Hulbert (1980) gereinigt wurde. Das deutete darauf hin, dass es sich bei den isolierten Proteinen tatsächlich um Proteine der äußeren Membran handelte und nicht um nicht solubilisierete Proteine der intrazellulären Membranen. Ein weiteres Indiz dafür war, dass die Sedimente nach der Solubilisierung annähernd weiß waren, was dafür sprach, dass ein Großteil der pigmentierten Proteine der photosynthetischen Membranen abgetrennt wurde. 2D-Gele der isolierten Proteine der äußeren Membran lieferten erste Hinweise darauf, dass es sich bei dem dominierenden Protein um mehrere Proteine mit gleichem Molekulargewicht aber unterschiedlichen isoelektrischen Punkten handelte. Neben dem dominierenden Protein der äußeren Membran waren noch weitere Proteine zu erkennen, wobei sie bei Größen um 72 kDa, 43 kDa, 22 kDa und 11 kDa lagen. Allerdings wurde keines der Proteine spezifisch bei Wachstum mit Elementarschwefel produziert, sondern es zeigte sich unter allen Wachstumsbedingungen das selbe Bandenmuster.

2.3.2.2 Isolierung nach Shen *et al.* (1989)

Mit einer weiteren Isolierung mit Hilfe der von Shen *et al.* (1989) zur Isolierung der Proteine der äußeren Membran von *Hyphomonas jannaschiana* verwendeten Methode wurde versucht, noch weitere Proteine der äußeren Membran zu isolieren. Auch diese Methode beruhte auf der Solubilisierung der Membranproteine, so dass wiederum die unlöslichen Proteine der äußeren Membran abgetrennt werden konnten. Allerdings wurde im Vergleich zur Methode von Hindennach & Henning (1975) Nonidet P40 zur Solubilisierung verwendet. In Abbildung 33b sind die mit dieser Methode isolierten Proteine zu sehen, wobei sie wieder von *Alc. vinosum*-Zellen stammten, die mit Malat, Sulfid und Elementarschwefel als Elektronendonoren angezogen wurden. Wieder war deutlich das dominierende Protein der äußeren Membran von *Alc. vinosum* bei 42 kDa zu sehen. Auch die anderen mit Hilfe der Methode von Hindennach & Henning isolierten Proteine waren bei dieser Isolierung zu finden, aber darüber hinaus wurden mit der Methode von Shen *et al.* (1989) noch viele weitere Proteine isoliert. Allerdings lag die Vermutung nahe, dass es sich bei zahlreichen dieser Proteine um intrazelluläre Membranproteine handelte, da die Sedimente, die vorwiegend Proteine der äußeren Membran enthalten sollten, noch stark rot gefärbt waren. Eine mehrmalige Solubilisierung mit Nonidet P40 in Folge brachte hier keine Verbesserung. Auch in den mit dieser Isolierungsmethode erhaltenen Bandenmustern zeigte sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Wachstumsbedingungen, so dass zwar vermutlich zusätzlich zu den mit der Methode von Hindennach & Henning (1975) erhaltenen Proteinen noch weitere Proteine der äußeren Membran isoliert werden konnten, aber auch keines von diesen für die Verwertung von Elementarschwefel spezifisch war.

2.3.3 Zell-Schwefelkontakt über extrazelluläre, polymere Substanzen

Da der Zell-Schwefelkontakt auch in *Alc. vinosum* durch EPS vermittelt werden könnte, wurde versucht, EPS von der Zelloberfläche zu extrahieren und deren Zusammensetzung zu bestimmen. Es wurden mehrere verschiedene Extraktionsmethoden angewendet, um möglichst große Mengen EPS zu gewinnen, ohne dabei die Zellen zu beschädigen, und dadurch die Extraktionen mit Zellbestandteilen zu verunreinigen. Tabelle 23 zeigt die DNA-Protein- und Zuckerkonzentrationen der EPS, die mit den verschiedenen Methoden gewonnen wurden. Am vielversprechendsten erschien eine Kombination aus physikalischen und chemischen Parametern. Sie führte zu sehr niedrigen DNA-Konzentrationen in der EPS-

Fraktion, die ein Indiz dafür waren, dass während der Extraktion nur wenige Zellen zerstört wurden. Gleichzeitig wurden größere Mengen Protein und Zucker extrahiert als das bei Extraktion durch Zentrifugation der Fall war.

Tabelle 23. Vergleich der DNA-, Protein- und Zuckerkonzentrationen bei Verwendung verschiedener Methoden zur Extraktion von extrazellulären, polymeren Substanzen.

Extraktionmethode	Konzentration [$\mu\text{g (mg Zellprotein)}^{-1}$]		
	DNA	Protein	Zucker
NaOH	2751,4	3053,2	1021,6
H ₂ SO ₄	435,3	96,3	669,5
70 °C	984,2	1592,0	1143,7
EDTA 1 g	710,3	53,1	52,7
EDTA 2 g	1094,8	57,2	45,1
EDTA 3 g	1694,8	32,7	64,6
EDTA 4 g	2282,1	16,4	77,5
Zentrifugation	5,3	9,8	4,4
physikalisch-chemisch	12,5	52,8	6,3

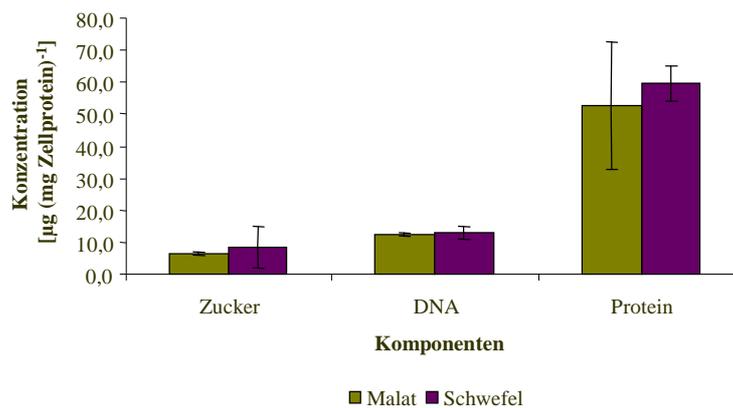


Abbildung 34. Vergleich der Zucker-, DNA- und Proteinkonzentrationen in EPS, die von *Alc. vinosum*-Zellen isoliert wurden, die auf Malat und Elementarschwefel gewachsen waren.

Daher wurde die Extraktion mit dieser Methode wiederholt, wobei diesmal die Zellen sowohl photoorganoheterotroph mit Malat als auch photolithoautotroph mit Elementarschwefel angezogen wurden. Abbildung 34 vergleicht die Zucker-, DNA- und Proteinkonzentrationen der beiden Extraktionen. Die Zusammensetzung beider Fraktionen ist völlig identisch.

2.3.4 Untersuchungen zur Rolle der Oberflächenladung der Zelle

Eine Anlagerung zwischen Schwefel und Zelle kann auch durch gegensätzliche Ladungen zwischen Zelle und Schwefel bedingt werden. Zur Untersuchung der Rolle der Ladung im

Zell-Schwefelkontakt sollte elektrostatisches “Layer-by-Layer nano selfassembly (LbL)” verwendet werden. Bei diesem Ansatz wurden zwei Ziele verfolgt: Zum einen sollte geklärt werden, ob die Ladung der Zelle Auswirkungen auf die Aufnahme von Elementarschwefel hat und zum anderen sollte diese Untersuchung dazu dienen, neue Ansätze für die Anwendung von LbL in der Biotechnologie zu finden.

Im Gegensatz zu Mak *et al.* (2004), welche die ersten Versuche zur Substrataufnahme in mit LbL eingekapselten Zellen durchgeführt haben und hierfür eine äußerste Schicht aus Enzymen auf die Zellen aufgebracht haben, die die Nutzung eines ansonsten durch *Arxula adenivorans* nicht verwertbaren Substrates ermöglichte, werden im Folgenden zwei andere Strategien genutzt, um eine kontrollierte Substrataufnahme in *Alc. vinosum* zu untersuchen. *Alc. vinosum* wurde mit verschiedenen Polyionen eingekapselt, womit definierte Zelloberflächen mit verschiedenen Ladungen und hydrophoben Eigenschaften geschaffen wurden. Zusätzlich wurden durch Einkapselung physikalische Barrieren um die Zellen erzeugt. Da die charakterisierten Polyelektrolytkapseln andere funktionelle Gruppen auf der natürlichen Zelloberfläche überlagerten, war es möglich, den Effekt von Oberflächenladung und hydrophoben Eigenschaften ohne den Einfluss - oder zumindest unter einem definierteren Einfluss - durch andere funktionale Gruppen auf der Zelloberfläche zu untersuchen.

2.3.4.1 ζ -Potential von *Alc. vinosum* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Im ersten Schritt wurde das ζ -Potential von *Alc. vinosum*-Zellen in zwei Kulturen bei photoorganoheterotrophem Wachstum mit Malat, in Nullmedium und während des Wachstums auf Sulfid bzw. Elementarschwefel bestimmt. In der ersten Kultur hatte *Alc. vinosum* bei Wachstum mit Malat ein ζ -Potential von $-3,56 \pm 0,80$ mV. Der Wechsel in Nullmedium führte dazu, dass die Zellen mit $-17,81 \pm 0,92$ mV deutlich negativer geladen waren. Zwei Stunden nach der Zugabe von Sulfid hatten die Zellen eine Ladung von $-20,78 \pm 0,59$ mV. Bei einem Wechsel von photoorganoheterotrophem Wachstum von Malat auf photolithoautotrophes Wachstum mit Elementarschwefel waren die Werte vergleichbar. Auf Malat betrug das ζ -Potential der Zellen $-3,57 \pm 0,52$ mV, beim Wechsel der Zellen in Nullmedium sank es auf $-18,53 \pm 1,47$ mV. Drei Stunden nach der Zugaben von Elementarschwefel lag der Wert bei $-21,30 \pm 0,77$ mV.

2.3.4.2 Elektrochemische Veränderungen der Zelloberfläche

Um den Einfluss der Oberflächenladung der Zelle auf die Oxidation von Sulfid und die Aufnahme von Elementarschwefel zu untersuchen, wurden fünf verschiedene Polymerkombinationen verwendet (Tabelle 24). Dabei handelte es sich bei einem Paar um einen Mix aus synthetischen und biokompatiblen Polymeren (PDDA/ PGA), während alle anderen Paare synthetische Polymere waren. Abbildung 35a und b zeigen die ζ -Potentiometermesswerte für *Alc. vinosum*-Zellen, die mit PDDA/ PGA bzw. PAH/ PSS eingekapselt wurden. *Alc. vinosum*-Zellen waren vor der Einkapselung negativ geladen (-35,3 bzw. -25,1 mV) und die weiteren Einkapselungsschritte zeigten Wechsel zwischen negativer und positiver Ladung, was die erfolgreiche Bildung einer Kapsel zeigte. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Kombinationen PDDA/ PSS, PAH/ PAA und PDDA/ PAA erhalten (Daten nicht gezeigt). Für jedes Polymerpaar wurde eine Kultur hergestellt, in der die Zellen mit drei Lagen überzogen wurden, was zu einer positiven Oberflächenladung der eingekapselten Zellen führte und die Zellen einer weiteren Kultur hatten negative Ladungen auf Grund von vier aufgetragenen Schichten. Die finalen ζ -Potentiale der eingekapselten Zellen sind in Tabelle 24 zu sehen. Neben den ζ -Potentiometerangaben wurde die Bildung von Kapseln auch durch konfokale Laser-ScanningMikroskopie überprüft (siehe unten). Abbildung 36 zeigt eine SEM-Aufnahme einer eingekapselten *Alc. vinosum*-Zelle.

Nach dem Einkapselungsprozess wurden die *Alc. vinosum*-Zellen in Nullmedium transferiert. In einer Reihe von Experimenten wurde Sulfid in unterschiedlichen Konzentrationen als Elektronendonator zu den Kulturen gegeben. Die Zellen waren während des Einkapselungsprozesses Sauerstoff und deionisiertem Wasser ausgesetzt und daher wurden Kontrollzellen der gesamten Einkapselungsprozedur mit vier Lagen unterzogen, allerdings ohne Polymere. Die Kontrollkulturen veränderten unter den Stressbedingungen ihre Farbe etwas von rot zu einer mehr bräunlich-roten Färbung, sie zeigten aber keine Unterschiede in der Oxidation von Sulfid im Vergleich zu *Alc. vinosum*-Zellen, die direkt von photoorganoheterotrophem Wachstum zu photolithoautotrophem Wachstum auf Sulfid transferiert wurden (Abbildung 37). Die Bildung von intrazellulären Schwefelkugeln, ein Maß für die Oxidation von Sulfid, und deren weitere Oxidation zu Sulfat waren in beiden Kulturen vergleichbar (Abbildung 37a und b). Auch die Proteinkonzentrationen der Kulturen nahmen leicht zu, was ein Wachstum mit Sulfid anzeigte (Abbildung 37c). Eine direkte Bestimmung der Sulfidkonzentrationen mittels HPLC, wie sie normalerweise in den anderen in dieser Arbeit gezeigten Versuchen gemacht wurde, war in diesem Fall nicht möglich, da die Arbeiten im

Tabelle 24. Einkapselungs- und Wachstumsbedingungen für *Alc. vinosum*.

Polymer- kombination/ Kultur	Anzahl der Lagen	Ober- flächen- ladung	Elektronendonor		finale ζ -Potential [mV]
			Sulfid [mM]	Elementar- schwefel [mM]	
<i>Alc. vinosum</i>	---	---	5	50	zwischen -48.1 und -4.5
Kontrolle mit 4 Lagen	---	---	5	50	-26.0
Kontrolle mit 6 Lagen	---	---	5	50	-24.5
PDDA/ PGA	3	+	5	50	63.3
PDDA/ PGA	4	-	5	50	-20.4
PAH/ PAA	3	+	5	50	14.5
PAH/ PAA	4	-	5	50	-27.4
PAH/ PSS	3	+	2	25	40.8
PAH/ PSS	4	-	2	25	-25.2
PDDA/ PSS	3	+	1	25	21.6
PDDA/ PSS	4	-	1	25	-10.2
PDDA/ PAA	3	+	0.5	25	23.7
PDDA/ PAA	4	-	0.5	25	-23.9
PAH/ PSS	5	+	5	50	24.8
PAH/ PSS	6	-	5	50	-35.2
PDDA/ PSS	5	+	5	50	17.2
PDDA/ PSS	6	-	5	50	-30.1

Labor von Prof. Dr. Yuri M. Lvov in Ruston, Louisiana stattfanden, wo diese Analytik nicht zur Verfügung stand. Allerdings ergaben sich für die mit verschiedenen Polymerkombinationen eingekapselten Zellen keine Unterschiede in der Sulfidoxidation, wenn diese mit 5 mM Sulfid als Elektronendonor angezogen wurden, wie an den vergleichbaren intrazellulären Schwefelkonzentrationen, der Bildung von Sulfat und den Proteinkonzentrationen der Kulturen zu sehen war (Abbildung 37, blaue Linien). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Aufnahme und Oxidation von Sulfid in den negativ und positiv geladenen Kulturen gleich war. Um sicher zu stellen, dass das negativ geladene Sulfid nicht alle positiven Ladungen auf der Zelloberfläche besetzte und dadurch weiterem Sulfid ermöglichte, durch die Polymerkapsel in die Zelle zu diffundieren, wurde in weiteren Experimenten Sulfid in abnehmenden Konzentrationen zu den Kulturen gegeben (2,0 mM, 1,0 mM und 0,5 mM; Abbildung 37a-c, jeweils rote, grüne und orange Linien). Interessanterweise führten aber auch reduzierte Sulfidkonzentrationen nicht zu Unterschieden in der Bildung von Schwefelkugeln oder Sulfat. Die Aufnahme und Oxidation von Sulfid wurde durch den Wechsel im ζ -Potential der Zelle nicht beeinträchtigt, obwohl das Substrat entgegengesetzt zu den mit drei Polymerschichten versehenen Zellen geladen war. Darüber

C Ergebnisse

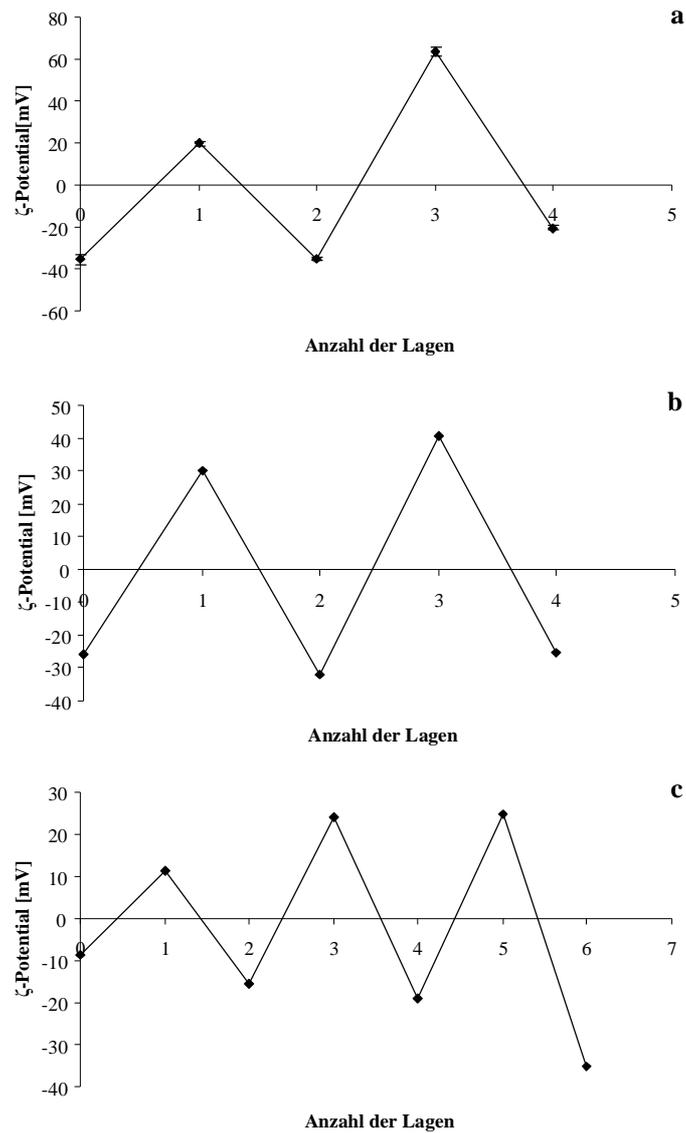


Abbildung 35. ζ -Potentiometermessungen während der Einkapselung von *Alc. vinosum* mit PDDA/ PGA (a) und PAH/ PSS (b) mit jeweils drei und vier Lagen und PAH/ PSS mit fünf und sechs Lagen.

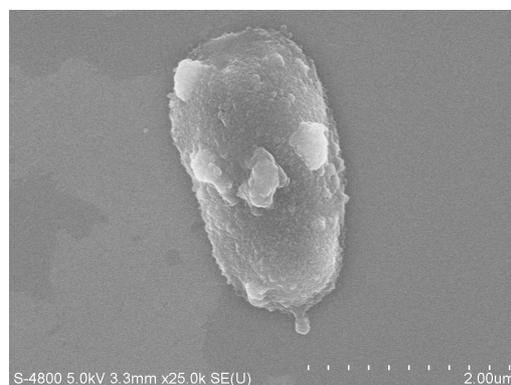


Abbildung 36. FE-SEM-Aufnahme von mit PAH/ PAA eingekapselter *Alc. vinosum*-Zelle während Wachstum auf Elementarschwefel.

hinaus zeigten die Ergebnisse aber, dass die Zellen trotz der Polymerkapsel lebensfähig und metabolisch aktiv waren.

In weiteren Experimenten wurde Elementarschwefel als Elektronendonator genutzt. Wieder wurden Protein- und Sulfatkonzentrationen als Indikatoren für die Aufnahme des Elementarschwefels bestimmt. Auch hier wurde der Einfluss von Sauerstoff und deionisiertem Wasser untersucht. Die bestimmten Protein- und Sulfatkonzentrationen zeigten, dass die Kontrollzellen zur Aufnahme von Elementarschwefel in der Lage waren und auch die Sulfatbildungsraten der Kontrollkulturen waren vergleichbar zu den nicht eingekapselten *Alc. vinosum*-Kulturen. Diese Ergebnisse zeigten, dass *Alc. vinosum* den Einkapselungsprozess in gutem Zustand überlebt.

Wie bei Wachstum mit Sulfid, zeigte sich auch bei Wachstum mit Elementarschwefel kein Unterschied in der Aufnahme des Schwefels. Die negativ und positiv geladenen Zellen hatten vergleichbare Sulfatbildungsraten und Proteinkonzentrationen, wenn sie mit 50 mM Elementarschwefel wuchsen (Abbildung 38, grüne Linien). Eine niedrigere Elementarschwefelkonzentration von 25 mM führte ebenfalls nicht zu Unterschieden in der Substrataufnahme (Abbildung 38, blaue Linien). In Abbildung 38a und b sind die Unterschiede in den Sulfat- und Proteinkonzentrationen, die sich auf Grund der unterschiedlichen zugegebenen Elementarschwefelkonzentrationen ergeben nicht zu sehen, da nur die ersten 72 h der Sulfatbildung und des Verlaufs der Proteinkonzentrationen gezeigt sind. Die vollständige Oxidation der intrazellulären Schwefelkugeln zu Sulfat dauerte über hundert Stunden und erst dann korrelierten die finalen Sulfatwerte mit den eingesetzten Schwefelkonzentrationen (siehe oben).

Zusammenfassend zeigten die erhaltenen Ergebnisse, dass die Oberflächenladung der Zelle allein keine essentielle Rolle für die Ausbildung des Schwefel-Zell-Kontaktes und damit für die Aufnahme von Elementarschwefel spielte. Auch der Einfluss hydrophober und hydrophiler Eigenschaften der Zelle wurde untersucht. PSS als äußere Schicht führte zu hydrophoberen Oberflächen als das anionische PAA (Krol *et al.*, 2003). Allerdings führte auch dieser Unterschied nicht zu signifikant verschiedener Elementarschwefelaufnahme.

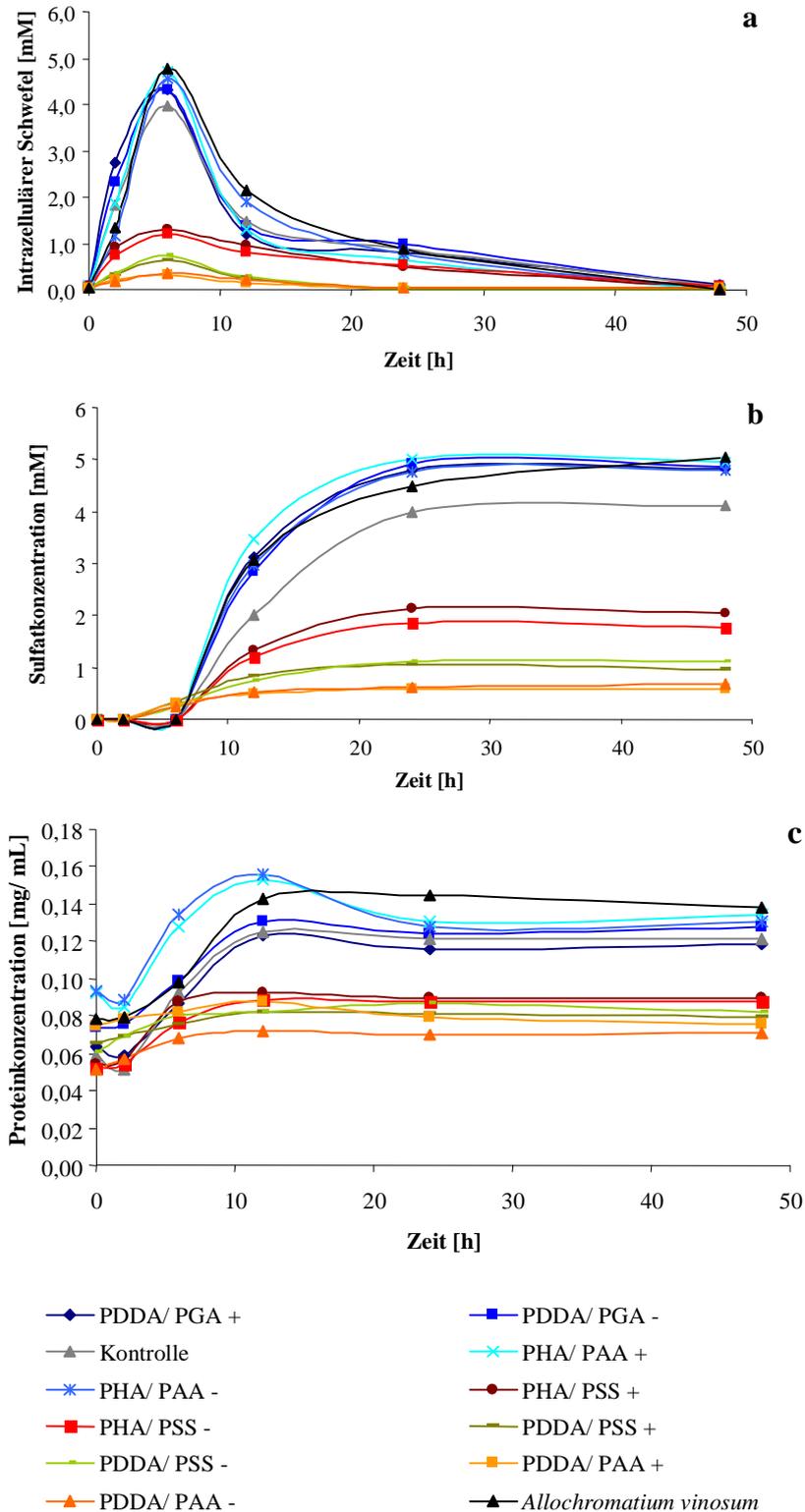


Abbildung 34. Konzentrationen des intrazellulären Schwefels (a), Sulfats (b) und Proteins (c) während des Wachstums von *Alc. vinosum* mit verschiedenen Sulfidkonzentrationen (0,5 mM: orange Linien; 1 mM: grüne Linien; 2 mM rote Linien; 5 mM blaue Linien). In schwarz sind die Werte für eine nicht eingekapselte *Alc. vinosum*-Kultur dargestellt, in grau die für eine Kontrollkultur, die allen Einkapselungsschritten unterzogen wurde, allerdings ohne Polymere. Jede farbige Linie zeigt Zellen die mit drei oder vier Lagen jedes Polymers eingekapselt wurden.

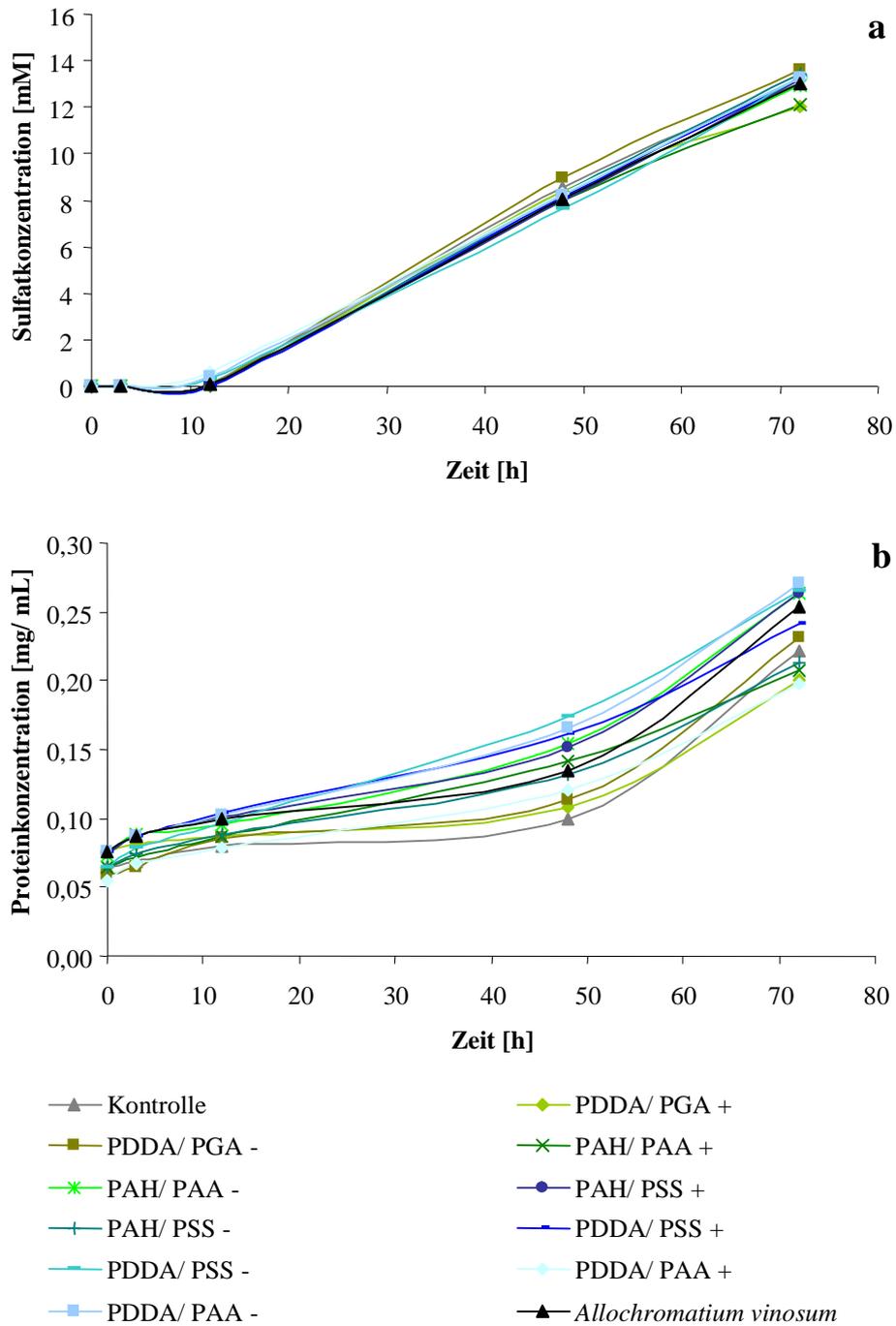


Abbildung 38. Sulfat- (a) und Proteinkonzentrationen (b) während des Wachstums von *Alc. vinosum* mit 25 mM (blaue Linien) und 50 mM (grüne Linien) Elementarschwefel. Jede farbige Linie repräsentiert Zellen, die jeweils mit drei und vier Polymerschichten eingekapselt wurden. In schwarz sind die Werte für eine nicht eingekapselte *Alc. vinosum*-Kultur dargestellt, in grau die für eine Kontrollkultur, die allen Einkapselungsschritten unterzogen wurde, allerdings ohne Polymere.

2.3.4.3 Bildung einer physikalischen Barriere

Alc. vinosum-Zellen wurden mit fünf und sechs Schichten aus zwei verschiedenen Polymerpaaren eingekapselt. Abbildung 35c zeigt die ζ -Potentiometermessungen während des Einkapselungsprozesses mit PAH/ PSS. Beginnend mit einer negativen Ladung der *Alc. vinosum*-Zellen änderten sich die Vorzeichen des ζ -Potentials mit jedem Einkapselungsschritt, was eine erfolgreiche Kapselbildung anzeigte. Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Einkapselung mit PDDA/ PSS erhalten, auf deren Darstellung der Übersichtlichkeit halber hier verzichtet wird. Um auch bei dieser Kapseldicke eventuelle Einflüsse der Oberflächenladung festzustellen, wurden wieder positiv (fünf Schichten) und negativ (sechs Schichten) geladene Zellen produziert (die ζ -Potentiale der eingekapselten Zellen sind in Tabelle 24 gezeigt). Die Kapselbildung wurde zusätzlich mit Hilfe von konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie überprüft (Abbildung 39). Hierfür wurde eine zusätzliche Schicht des Fluoreszenzfarbstoffes FITC auf die positiv geladenen Zellen aufgebracht, was zu einem grünen Ring um die eingekapselten Zellen führt. Etwas Farbstoff diffundierte ebenfalls in die Zellen und färbte dort bevorzugt die Schwefelkugeln an. Abbildung 39 zeigt dies für mit PAH/ PSS eingekapselte Zellen während des Wachstums auf Elementarschwefel, wobei die umgebende Kapsel als grüner Ring und der aufgenommene Schwefel als grüne Strukturen in der Zelle zu erkennen sind.

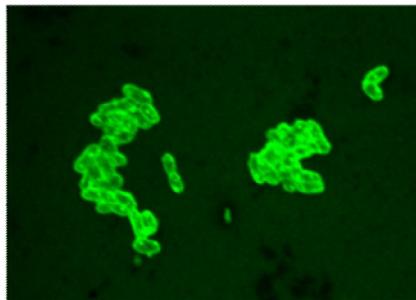


Abbildung 39. Konfokale Laser-Scanning Mikroskop-Aufnahme der Kapselbildung an mit PAH/ PSS eingekapselten *Alc. vinosum*-Zellen während des Wachstums mit Elementarschwefel.

Nach der Einkapselung wurden die Zellen entweder mit 5 mM Sulfid oder 50 mM Elementarschwefel kultiviert. Da eine größere Anzahl an Schichten dazu führte, dass die Zellen während des Einkapselungsprozesses länger Sauerstoff und deionisiertem Wasser ausgesetzt waren, wurde eine weitere Kultur wie die eingekapselten Zellen behandelt - allerdings ohne Polymere. Trotz des verlängerten Einkapselungsprozesses zeigten die Kontrollzellen weiterhin vergleichbares Wachstum auf Sulfid und Elementarschwefel wie

C Ergebnisse

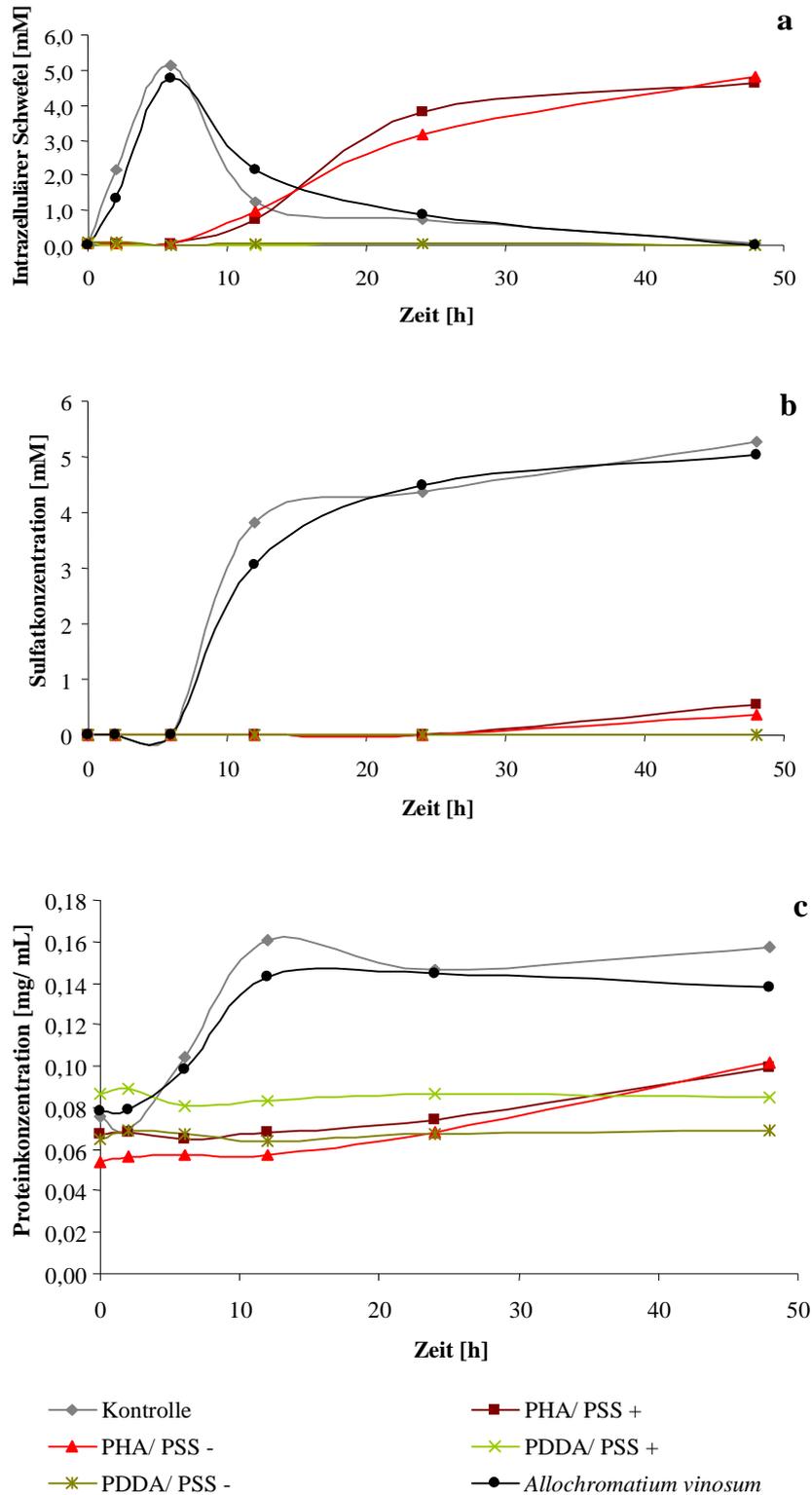


Abbildung 40. Konzentrationen des intrazellulären Schwefels (a), Sulfats (b) und Proteins (c) während des Wachstums von *Alc. vinosum* mit 5 mM Sulfid. Mit roten Linien sind Zellen dargestellt, die mit fünf und sechs Schichten PAH und PSS eingekapselt wurden, die grünen Linien zeigen Zellen, die mit fünf oder sechs Schichten PDDA und PSS eingekapselt wurden. In schwarz sind die Werte für eine nicht eingekapselte *Alc. vinosum*-Kultur dargestellt, in grau die für eine Kontrollkultur, die allen Einkapselungsschritten unterzogen wurde, allerdings ohne Polymere.

Alc. vinosum-Zellen, die direkt von photoorganoheterotrophem Wachstum auf Malat auf photolithoautotrophes Wachstum mit reduzierten Schwefelverbindungen umgestellt wurden (Abbildungen 40 und 41, graue Linien). Diese Ergebnisse zeigten, dass der verlängerte Einkapselungsprozess keine Auswirkungen auf die metabolische Aktivität der Zellen hatte.

Bei Wachstum mit Sulfid nahmen die mit fünf oder sechs Schichten PAH und PSS eingekapselten Zellen - positiv geladene genauso wie negativ geladene - das Sulfid während 48 h langsamer auf als die Kontrollzellen. Abbildung 40a und b (rote Linien) zeigen jeweils die langsamere Bildung von intrazellulären Schwefelkugeln und Sulfat. Zudem stieg die Proteinkonzentration der Kulturen während dieser Zeit nur leicht an. Zellen, die mit PDDA und PSS eingekapselt wurden, nahmen dagegen während 48 h überhaupt kein Sulfid mehr auf (Abbildung 40, grüne Linien). Es waren keine intrazellulären Schwefelkugeln und Sulfat nachweisbar und die Proteinkonzentration der Kulturen blieb konstant. Während die Oberflächenladung der Zellen die Aufnahme und Oxidation von Sulfid nicht beeinflusste, konnte durch eine Polymerkapsel aus vielen Schichten eine physikalischen Barriere, die die Diffusion des Substrates in die Zelle verhinderte, errichtet werden.

Bei Wachstum mit Elementarschwefel als Elektronendonator ergab sich ein ähnliches Bild. Eine physikalische Barriere um die Zellen inhibierte die Aufnahme von Elementarschwefel unabhängig von der Oberflächenladung der Zelle. Die Einkapselung mit PAH und PSS führte zu verlangsamer Substrataufnahme, wie die minimale Bildung von Sulfat und der leichte Anstieg in der Proteinkonzentration während 72 h zeigte (Abbildung 41, rote Linien). Aus PDDA und PSS aufgebaute Kapseln blockierten vollständig die Aufnahme von Elementarschwefel, was daran zu sehen war, dass kein Sulfat gebildet wurde und auch die Proteinkonzentration der Kulturen konstant blieb (Abbildung 41, grüne Linien).

Die Ergebnisse zeigten, dass zahlreiche mit Hilfe von LbL auf die Bakterienoberfläche aufbrachte Polymerschichten eine physikalische Barriere zwischen Zellen und dem umgebenden Medium schafften und somit die Aufnahme bestimmter Substrate inhibieren konnten. Die Anzahl der Schichten und die Wahl der Polyelektrolyte, die für die Einkapselung genutzt wurden, beeinflussten zudem die Dimension der physikalischen Barriere, was eine große Flexibilität für die Schaffung von Oberflächenmodifikationen vor allem für angewandte Fragen der Mikrobiologie schafft. Das deutet auf ein Anwendungspotential von LbL in der Biotechnologie hin, womit der zweite Teil der Fragestellung, die zu diesen Versuchen führte, positiv beantwortet werden kann. Für den ersten Teil der Fragestellung - die Frage, ob die Oberflächenladung der Zelle an der Ausbildung des für die Aufnahme von Elementarschwefel nötigen Zellschwefelkontaktes

verantwortlich ist - ergab sich, dass ein Einfluss der Zellladung wohl ausgeschlossen werden kann.

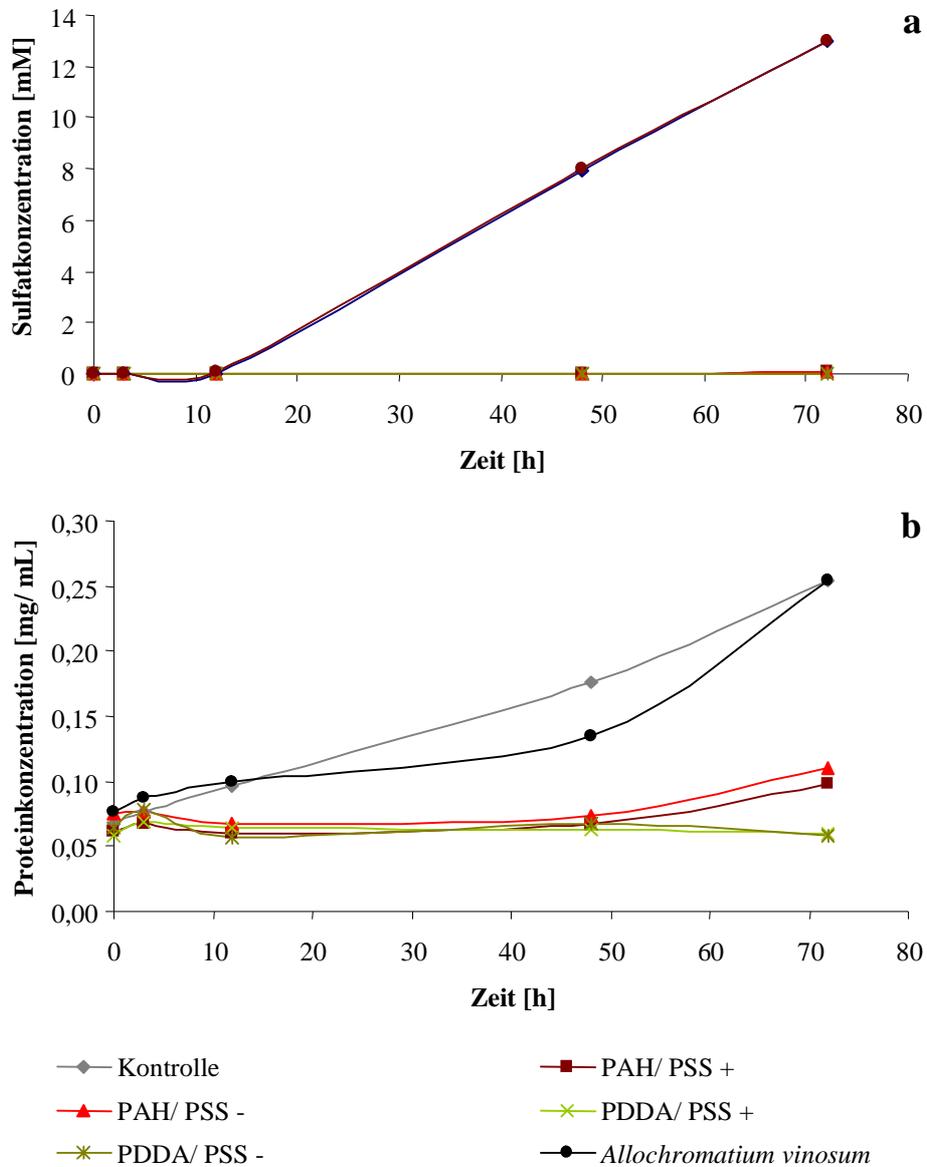


Abbildung 41. Sulfat- (a) und Proteinkonzentrationen (b) während des Wachstums von *Alc. vinosum* mit 50 mM Elementarschwefel. Mit roten Linien sind Zellen dargestellt, die mit jeweils fünf und sechs Schichten PAH und PSS eingekapselt wurden und die grünen Linien zeigen mit jeweils fünf und sechs Schichten PDDA und PSS eingekapselte Zellen. In schwarz sind die Werte für eine nicht eingekapselte *Alc. vinosum*-Kultur dargestellt, in grau die für eine Kontrollkultur, die allen Einkapselungsschritten unterzogen wurde, allerdings ohne Polymere.

2.4 Einfluss von Inhibitoren auf die Schwefelaufnahme in *Alc. vinosum*

Über die Aufnahme reduzierter Schwefelverbindungen in *Alc. vinosum* ist bisher wenig bekannt. Für die kleinen Moleküle Sulfid, Thiosulfat und Sulfit ist denkbar, dass sie über spezifische oder unspezifische Porine über die äußere Membran ins Periplasma diffundieren, wo die beiden ersteren zu intrazellulärem Schwefel - bzw. im Fall von Thiosulfat der Sulfonschwefel auch direkt zu Sulfat - oxidiert werden. Für die Aufnahme von elementarem Schwefel konnten bisher entweder keine wasserlöslichen, kleinen Intermediate wie Sulfid nachgewiesen werden, die dann durch Diffusion in die Zelle gelangen oder eine essentielle Rolle der gefundenen Verbindungen für die Schwefelaufnahme konnte ausgeschlossen werden. Um weitere Informationen über die Schwefelaufnahme in *Alc. vinosum* zu erhalten, wurde im Folgenden die Aufnahme von Elementarschwefel unter dem Einfluss von verschiedenen Inhibitoren und Entkopplern untersucht. Hierfür wurden *Alc. vinosum*-Kulturen photolithoautotroph mit 50 mM Elementarschwefel, 2 mM Sulfid oder 2 mM Thiosulfat in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors oder Entkopplers angezogen.

2.4.1 Zugabe von CCCP

Bei der schwachen Base CCCP handelt es sich um einen Entkoppler, mit dessen Hilfe der elektrochemische Protonengradient kurzgeschlossen werden kann (Kasianowicz *et al.*, 1984). CCCP wurde in Konzentrationen von 5, 10, 20, 30, 40 und 100 μM zu den Kulturen gegeben. Bei Wachstum mit Elementarschwefel als Elektronendonator kam ab einer Konzentration von 20 μM CCCP die Aufnahme des Schwefels vollständig zum Erliegen. Unter dem Mikroskop wurde keine Bildung von Schwefelkugeln beobachtet und auch Sulfat konnte in einem Zeitraum von 164 h nicht detektiert werden, während in der Kontrolle ohne CCCP nach 3 h erste Schwefelkugeln unter dem Mikroskop zu sehen waren und die Oxidation der Schwefelkugeln zu Sulfat nach 21 h bereits begonnen hatte (Abbildung 42a). Auch CCCP-Konzentrationen von 5 und 10 μM führten zu einer Verlangsamung der Schwefelaufnahme. Hier waren die ersten Schwefelkugeln unter dem Mikroskop erst nach 6 h zu sehen und auch die Bildung von Sulfat war verzögert. Die Proteinkonzentrationen der Kulturen spiegelten die verzögerte Schwefelaufnahme ebenfalls wieder (Abbildung 42b). Bei Zugabe von 5 und 10 μM CCCP stieg die Proteinkonzentration bereits langsamer an, während sie ab einer Konzentration von 20 μM konstant blieb. Insgesamt deuteten diese Ergebnisse darauf hin,

dass für die Aufnahme von Elementarschwefel Energie aus dem elektrochemischen Protonengradienten der Zelle benötigt wurde.

Betrachtete man die Oxidation von Sulfid in Anwesenheit von CCCP, zeigte sich ein völlig anderes Bild. Im Vergleich zur Kontrollkultur, in der Sulfid innerhalb der ersten fünf Stunden vollständig oxidiert wurde, führte CCCP zu einer leichten Verzögerung des Beginns der

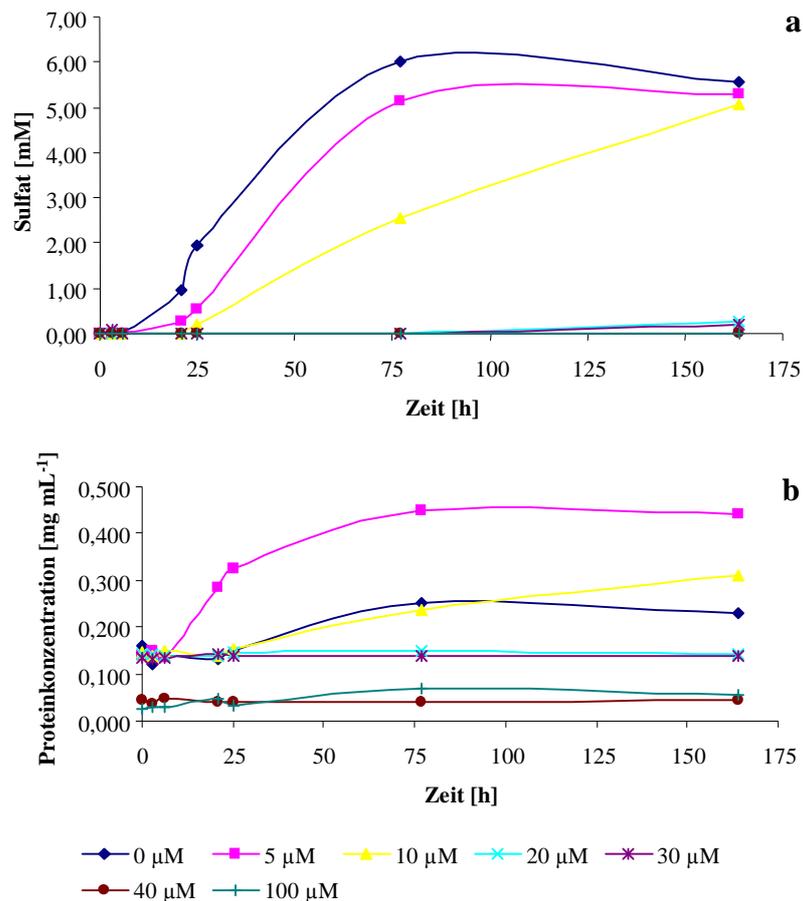


Abbildung 42. Umsatz reduzierter Schwefelverbindungen in *Alc. vinosum* während der Verwertung von Elementarschwefel in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen des Entkopplers CCCP. Dabei zeigt (a) die Bildung von Sulfat und (b) den Verlauf der Proteinkonzentration der Kultur.

Sulfidoxidation wie man sowohl am Verlauf der Sulfidkonzentrationen als auch an der Bildung der intrazellulären Schwefelkugeln sehen konnte (Abbildung 43a und b). Während einer Stunde wurde Sulfid von den Zellen kaum verwertet. Das Ausmaß dieses verzögerten Beginns war allerdings unabhängig von der CCCP-Konzentration. Nach der kurzen Lagphase verlief die weitere Sulfidoxidation dann auch mit Raten, die denen der Kontrollkultur vergleichbar waren (Tabelle 25).

Die einzige Ausnahme stellte hier die Oxidationsrate bei einer CCCP-Konzentration von 40 μ M dar. Da allerdings die Oxidationsrate bei der deutlich höheren Konzentration von

Tabelle 25. Sulfidoxidationsraten von *Alc. vinosum* in Anwesenheit des Entkopplers CCCP.

CCCP-Konzentration [μM]	Sulfidoxidationsrate [$\text{nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$]
0	17,3
5	25,5
10	20,2
20	16,0
30	27,9
40	9,2
100	23,6

100 μM wieder einen der Kontrolle vergleichbaren Wert zeigte, war dieser abweichende Wert wohl in erster Linie auf die im Vergleich zu den anderen Kulturen deutlich niedrigere Ausgangskonzentration an Sulfid in der Kultur zurückzuführen. Auch der Aufbau der Schwefelkugeln verlief in Anwesenheit von CCCP vergleichbar zu dem in der Kontrollkultur. Erst beim Abbau der Schwefelkugeln und ihrer weiteren Oxidation zu Sulfat machte sich die Entkopplung des Protonengradienten deutlich bemerkbar und führte zu stark verlangsamter Oxidation des intrazellulären Schwefels (Abbildung 43b und c). Betrachtete man den Prozess der Sulfidoxidation und damit auch der Aufnahme von Sulfid in die Zelle, zeigte sich, dass diese im Gegensatz zur Aufnahme von Elementarschwefel vom elektrochemischen Protonengradienten der Zelle unabhängig war.

Im Gegensatz zur Sulfidoxidation wirkte sich CCCP auf die Oxidation von Thiosulfat ab einer Konzentration von 20 μM viel stärker aus. Während bei Anwesenheit von 5 und 10 μM CCCP sowohl die Oxidation von Thiosulfat als auch die Bildung von Schwefelkugeln wie in der Kontrollkultur abliefen, führten Konzentrationen von 20 μM und höher zu einem chaotischen Verlauf der Thiosulfatkonzentration und dem Auf- und Abbau der Schwefelkugeln (Abbildung 44a und b). Auch in der Bildung von Sulfat spiegelte sich der gestörte Auf- und Abbau der Schwefelkugeln wieder (Abbildung 44c). Allerdings wurde bei keiner der hier verwendeten Konzentrationen die Aufnahme des Thiosulfat in die Zelle vollständig unterbunden, wie das bei der Aufnahme von Elementarschwefel der Fall ist. Bei allen Konzentrationen wurden Schwefelkugeln gebildet, auch wenn ihr Aufbau langsamer erfolgte und insgesamt weniger intrazellulärer Schwefel nachgewiesen wurde als in der Kontrolle. Wäre das mittels XANES-Spektroskopie nachgewiesene Thiosulfat ein essentielles Zwischenprodukt bei der Schwefelmobilisation, hätte man die selbe Wirkung von CCCP auf die Oxidation von Thiosulfat erwartet, die es auf die Aufnahme von Elementarschwefel hat.

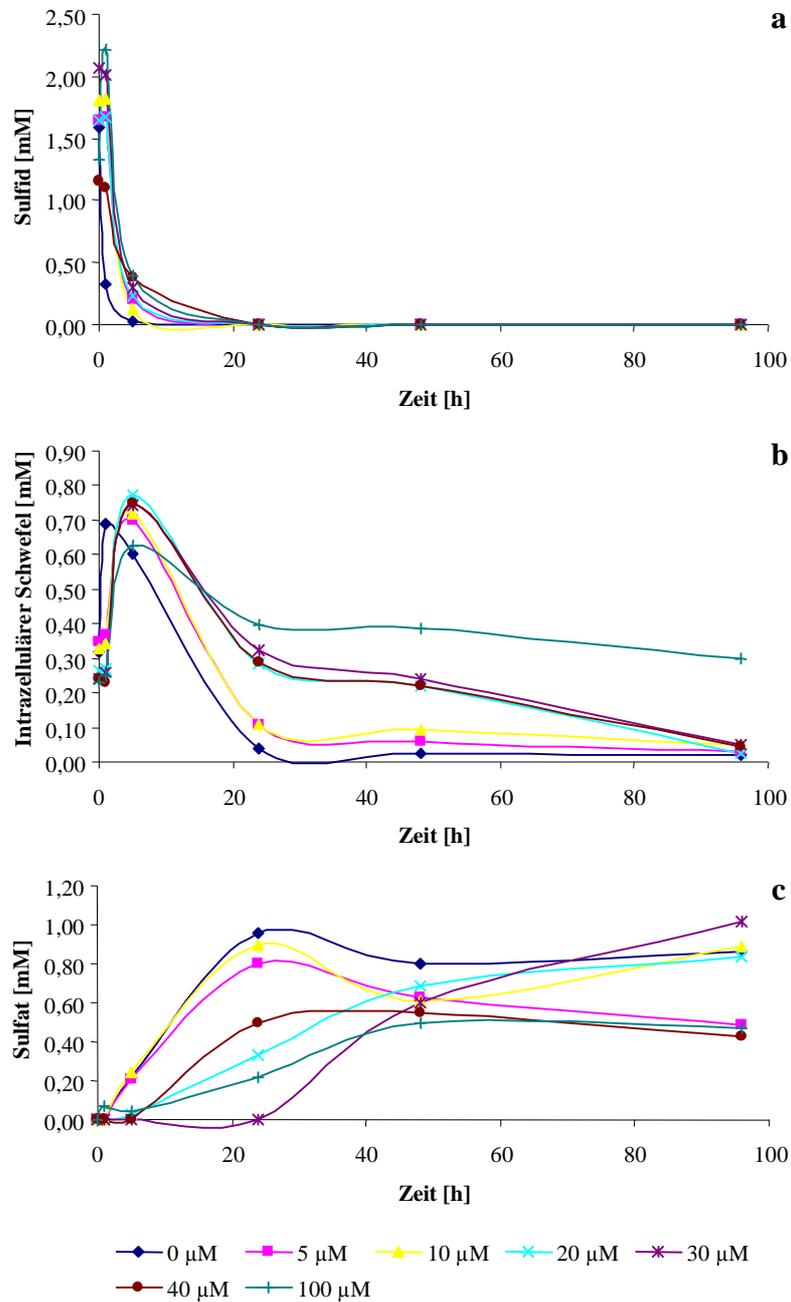


Abbildung 43. Umsatz reduzierter Schwefelverbindungen in *Alc. vinosum* während der Oxidation von Sulfid in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen des Entkopplers CCCP. Dabei zeigt (a) den Verlauf der Sulfidkonzentration in der Kultur, (b) den Verlauf der intrazellulären Schwefelkonzentration und (c) die Bildung von Sulfat. Die Proteinkonzentrationen der Kulturen betragen 280 -320 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

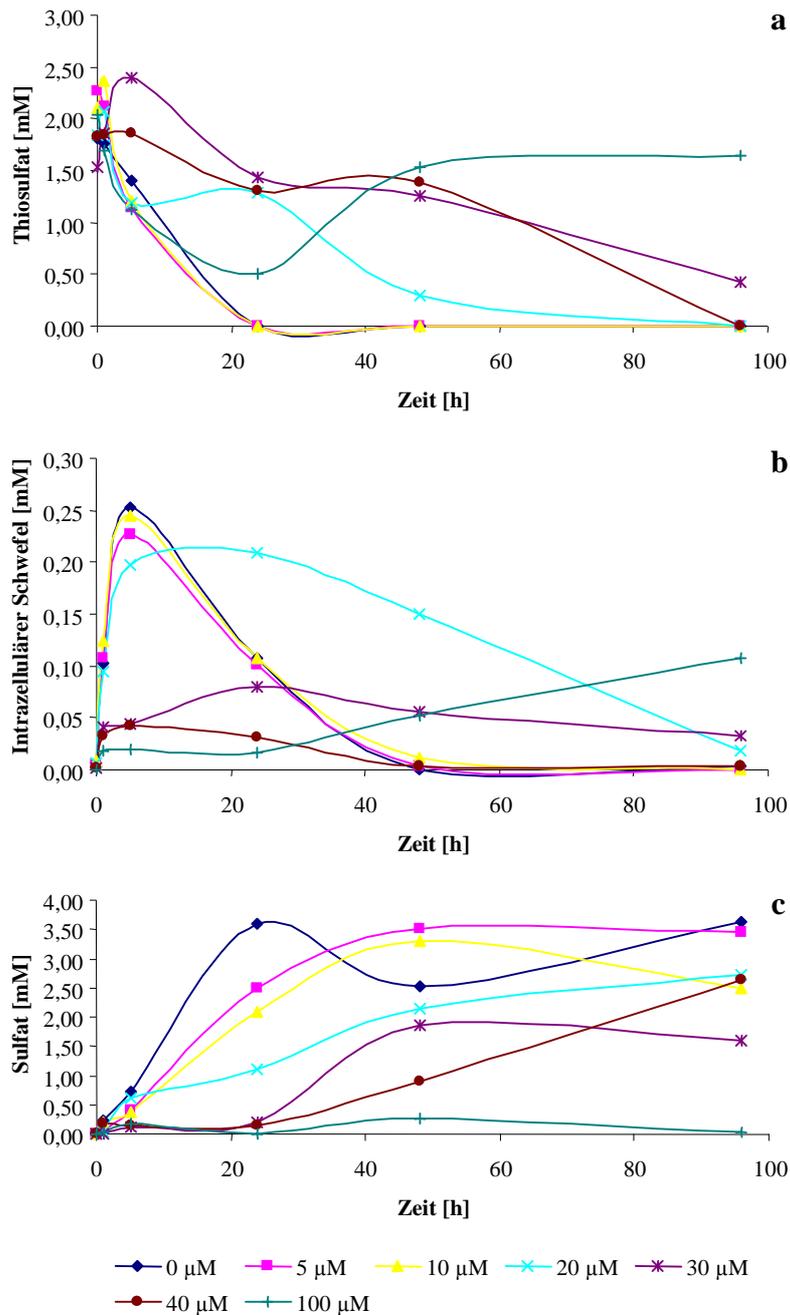


Abbildung 44. Umsatz reduzierter Schwefelverbindungen in *Alc. vinosum* während der Oxidation von Thiosulfat in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen des Entkopplers CCCP. Dabei zeigt (a) den Verlauf der Thiosulfatkonzentration in der Kultur, (b) den Verlauf der intrazellulären Schwefelkonzentration und (c) die Bildung von Sulfat. Die Proteinkonzentrationen der Kulturen betragen $260 - 310 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.4.2 Zugabe von Natriumarsenat

Die ATP-Synthase setzt, angetrieben durch den elektrochemischen Protonengradienten, Phosphat und ADP zu ATP um. Phosphat kann durch Arsenat ersetzt werden, wodurch die

ATP-Synthase zwar aktiv bleibt, aber die Bildung von ATP unterbleibt (Gresser, 1981). In weiteren Wachstumsversuchen wurde daher durch Zugabe von Natriumarsenat untersucht, ob die Aufnahme von Elementarschwefel ATP-abhängig ist.

Alc. vinosum wurde wieder photolithoautotroph mit 50 mM Elementarschwefel angezogen wobei 0,5 mM, 4 mM, 10 mM, 13 mM, 16 mM und 20 mM Natriumarsenat zugegeben wurden. In allen Kulturen konnte unter dem Mikroskop wie in der Kontrollkultur ohne Natriumarsenat nach 3 h die Bildung von ersten Schwefelkugeln in den Zellen beobachtet werden. Auch die Bildung von Sulfat setzte in allen Kulturen nach 21 h ein (Abbildung 45a). Im Verlauf der Proteinkonzentrationen zeigte sich eine leichte Abweichung zwischen der Kontrollkultur und den Kulturen zu denen Natriumarsenat gegeben wurde. Während die Proteinkonzentration in der Kontrollkultur sofort kontinuierlich anstieg, sank sie in den Kulturen mit Natriumarsenat in den ersten 21 h leicht und stieg dann erst an (Abbildung 45b). Dieser Effekt war allerdings unabhängig von der Natriumarsenatkonzentration, so dass davon

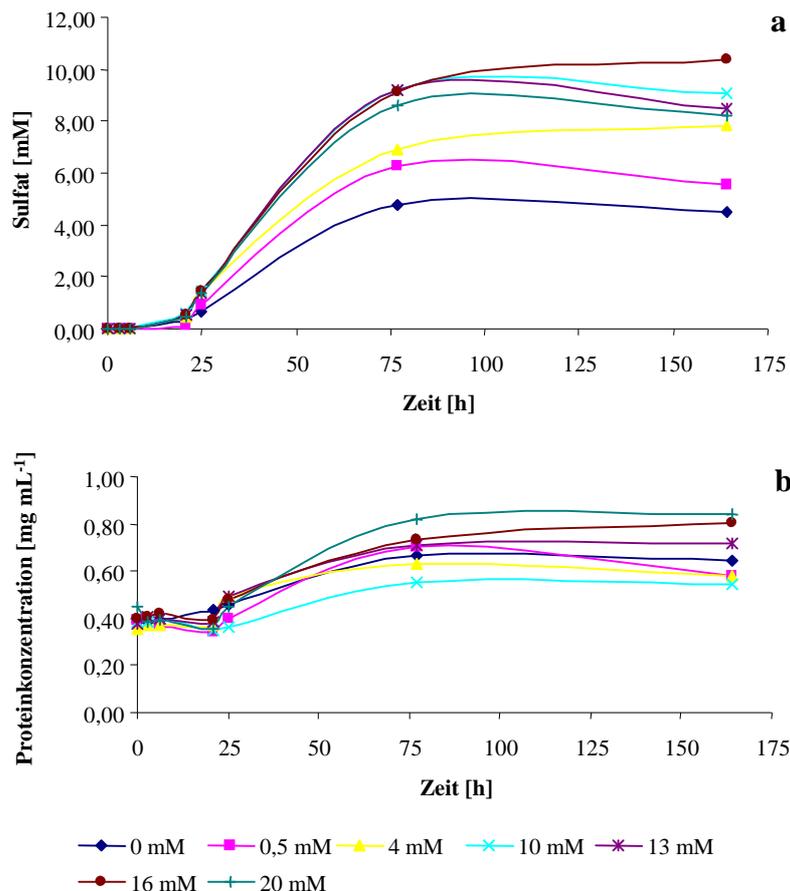


Abbildung 45. Verwertung von Elementarschwefel durch *Alc. vinosum* in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen Natriumarsenats. Dabei zeigt (a) die Bildung von Sulfat und (b) die Entwicklung der Proteinkonzentration in der Kultur.

ausgegangen werden konnte, dass die Aufnahme von Elementarschwefel in die Zelle ATP-unabhängig erfolgte.

Auch auf die Oxidation von Sulfid zeigte ein Inhibieren der ATP-Synthese keine Auswirkungen. Alle Kulturen oxidierten Sulfid mit Raten, die denen der Kontrollkultur vergleichbar waren (Tabelle 26, Abbildung 46a). Auch der Auf- und Abbau der Schwefelkugeln und die Bildung von Sulfat verlief gleich (Abbildung 46b und c). Das zeigte, dass auch die Aufnahme von Sulfid in die Zelle ATP-unabhängig erfolgte.

Tabelle 26. Sulfid- und Thiosulfatoxidationsraten von *Alc. vinosum* in Anwesenheit von Natriumarsenat.

Natriumarsenat- konzentration [mM]	Sulfidoxidationsrate [nmol min⁻¹ (mg Protein)⁻¹]	Thiosulfatoxidationsrate [nmol min⁻¹ (mg Protein)⁻¹]
0	10,6	6,7
0,5	7,8	4,8
4	9,4	5,8
10	9,4	5,5
13	9,9	5,1
16	9,3	3,7
20	10,3	5,1

Betrachtete man die Oxidation von Thiosulfat in Anwesenheit von Natriumarsenat, zeigte sich auch hier keine Auswirkung der Inhibierung der ATP-Synthase auf die Verwertung dieses Substrates. Die Kulturen mit Natriumarsenat oxidierten Thiosulfat mit Raten, die nur wenig niedriger lagen als die der Kontrollkultur ohne Natriumarsenat (Tabelle 26, Abbildung 47a). Auch der Aufbau der Schwefelkugeln und die Bildung von Sulfat verliefen in allen Kulturen sehr ähnlich (Abbildungen 47b und c). Daraus ließ sich schließen, dass auch die Aufnahme von Thiosulfat in die Zelle ATP-unabhängig verlief.

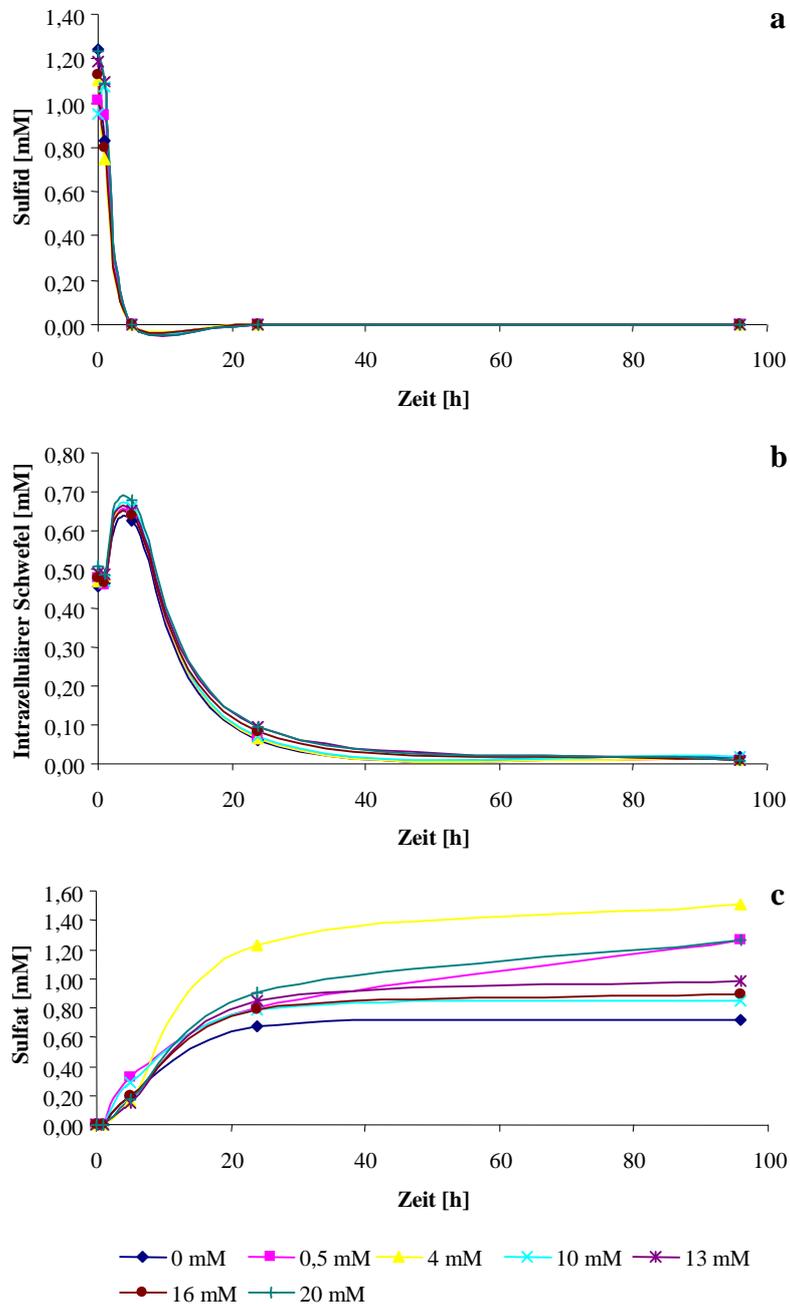


Abbildung 46. Umsatz reduzierter Schwefelverbindungen in *Alc. vinosum* während der Oxidation von Sulfid in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen von Natriumarsenat. Dabei zeigt (a) den Verlauf der Sulfidkonzentration in der Kultur, (b) den Verlauf der intrazellulären Schwefelkonzentration und (c) die Bildung von Sulfat. Die Proteinkonzentrationen der Kulturen betragen 380 - 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

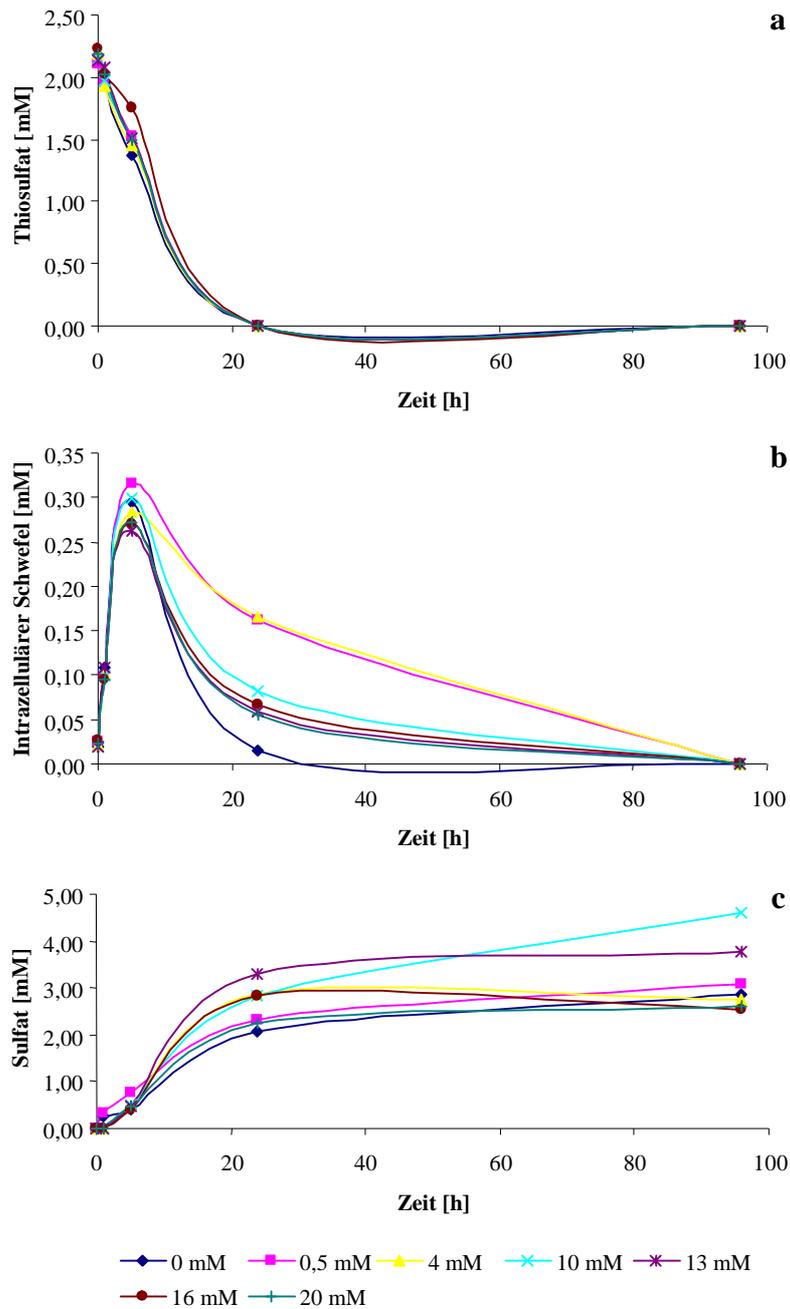


Abbildung 47. Umsatz reduzierter Schwefelverbindungen in *Alc. vinosum* während der Oxidation von Thiosulfat in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen von Natriumarsenat. Dabei zeigt (a) den Verlauf der Thiosulfatkonzentration in der Kultur, (b) den Verlauf der intrazellulären Schwefelkonzentration und (c) die Bildung von Sulfat. Die Proteinkonzentrationen der Kulturen betragen $370 - 400 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.4.4 Zugabe von Iodacetamid

Iodacetamid (IAA) bindet Thiolgruppen und verhindert dadurch, dass sie mit ihrem natürlichen Substrat interagieren können. *Alc. vinosum* wurde photolithoautotroph mit Elementarschwefel in Anwesenheit von $5 \mu\text{M}$, $40 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ IAA kultiviert. Bereits bei

einer Konzentration von 5 μM IAA wurde kein Elementarschwefel mehr aufgenommen. Unter dem Mikroskop konnten keine Schwefelkugeln beobachtet werden und es erfolgte auch keine Bildung von Sulfat (Abbildung 48a). Die Proteinkonzentrationen fielen nach der Zugabe von IAA, stiegen dann abrupt an und blieben schließlich konstant (Abbildung 48b).

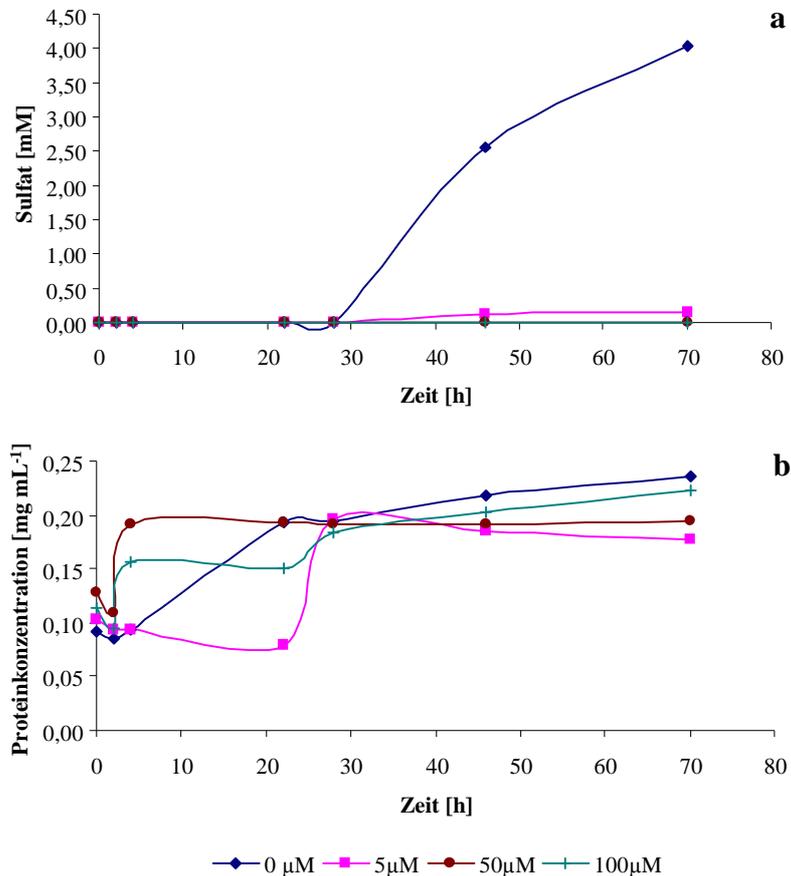


Abbildung 48. Verwertung von Elementarschwefel durch *Alc. vinosum* in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen Iodacetamid. Dabei zeigt (a) die Bildung von Sulfat und (b) die Entwicklung der Proteinkonzentration in der Kultur.

Auf die Oxidation von Sulfid hatte IAA keinen Einfluss. Die Abnahme von Sulfid im Medium verlief in Anwesenheit von IAA vergleichbar zur Kontrolle (Abbildung 49a, Tabelle 27) und auch der Aufbau der Schwefelkugeln gestaltete sich entsprechend (Abbildung 49b).

Tabelle 27. Sulfid- und Thiosulfatoxidationsraten von *Alc. vinosum* in Anwesenheit von Iodacetamid.

IAA-Konzentration [μM]	Sulfidoxidationsrate [$\text{nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$]	Thiosulfatoxidationsrate [$\text{nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$]
0	18,6	14,0
5	21,4	9,1
40	19,8	7,9
100	22,5	11,5

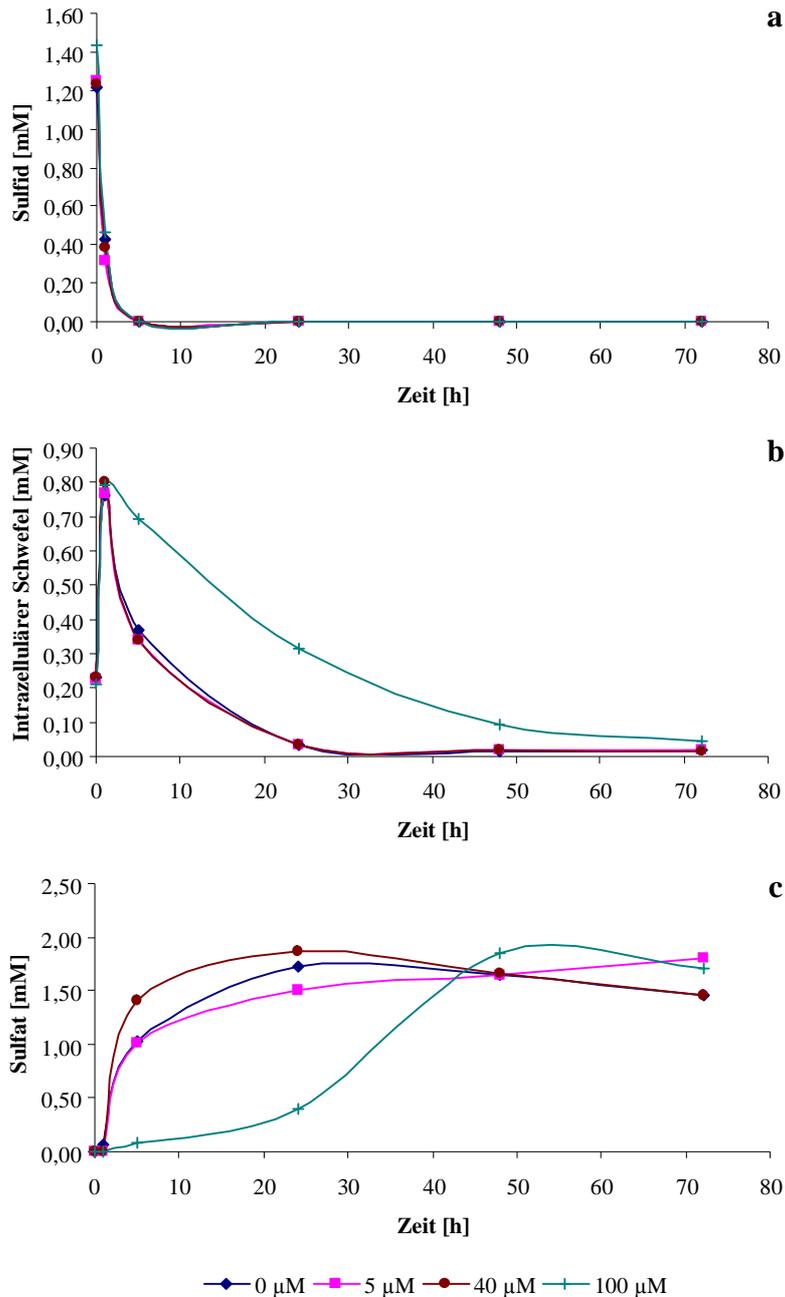


Abbildung 49. Umsatz reduzierter Schwefelverbindungen in *Alc. vinosum* während der Oxidation von Sulfid in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen von Iodacetamid. Dabei zeigt (a) den Verlauf der Sulfidkonzentration in der Kultur, (b) den Verlauf der intrazellulären Schwefelkonzentration und (c) die Bildung von Sulfat. Die Proteinkonzentrationen der Kulturen betragen 700 - 720 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Allerdings wurde der intrazellulär gespeicherte Schwefel bei einer Konzentration von 100 μM IAA verlangsamt abgebaut, was sich auch bei der Bildung von Sulfat zeigte (Abbildung 49c). Auch die Oxidation von Thiosulfat wurde in Anwesenheit von IAA nicht vollständig inhibiert. Die Abnahme des Substrats im Medium (Abbildung 50a) unterschied sich nicht signifikant von der Kontrolle ohne IAA. Allerdings waren die Oxidationsraten in

Anwesenheit von IAA etwas niedriger (Tabelle 27). Auf- und Abbau der Schwefelkugeln verliefen wenig vergleichbar (Abbildung 50b). Allerdings gestaltete sich eine Interpretation dieser Ergebnisse relativ schwierig, da die Probenaufnahme in sehr großen Abständen erfolgte, was die Ergebnisse leicht verzerrte.

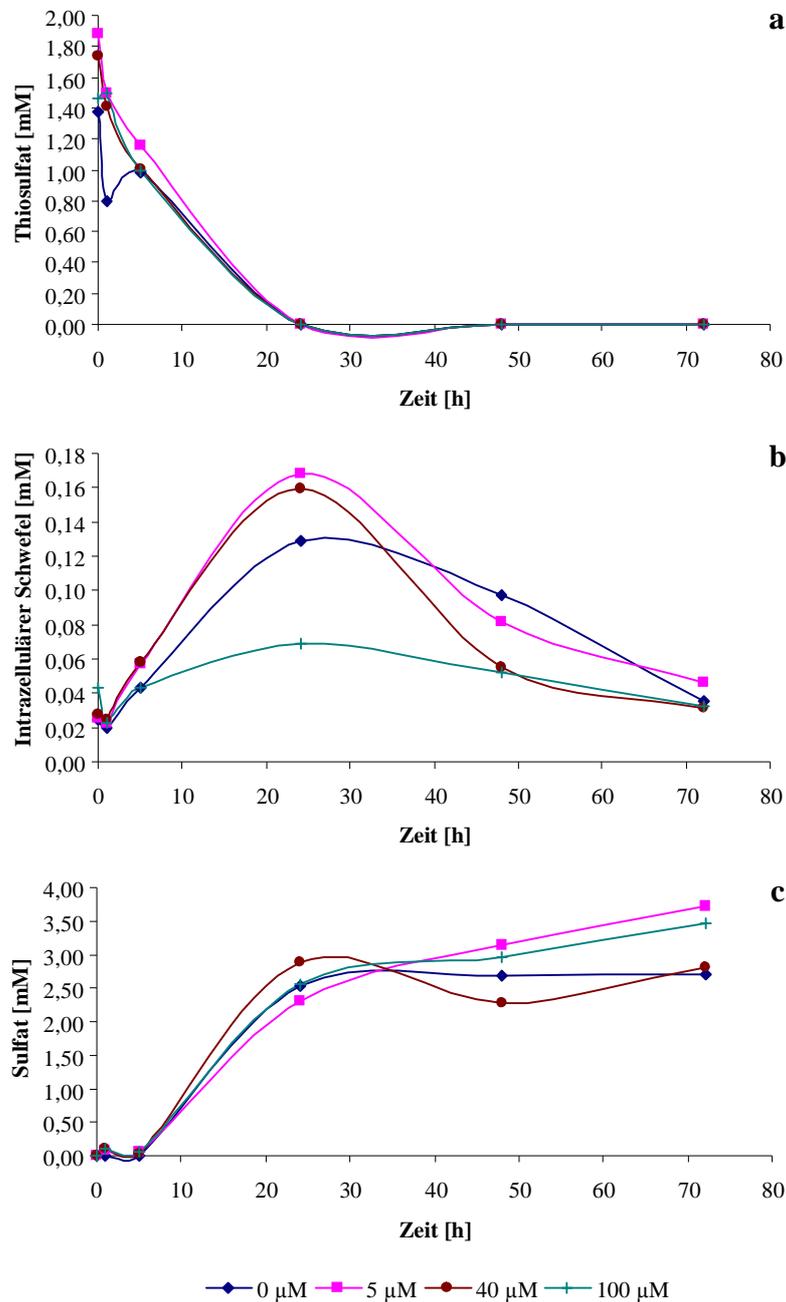


Abbildung 50. Umsatz reduzierter Schwefelverbindungen in *Alc. vinosum* während der Oxidation von Thiosulfat in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen von Iodacetamid. Dabei zeigt (a) den Verlauf der Thiosulfatkonzentration in der Kultur, (b) den Verlauf der intrazellulären Schwefelkonzentration und (c) die Bildung von Sulfat. Die Proteinkonzentrationen der Kulturen betragen 700 - 720 µg mL⁻¹.

D Diskussion

1 Untersuchungen zum Sox-Multienzymkomplex in *Alc. vinosum*

1.1 Sulfitoxidation in *Alc. vinosum*

Bezüglich der Sulfitoxidation in *Alc. vinosum* bestehen noch viele offene Fragen. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann eine maßgebliche Beteiligung des kompletten Sox-Multienzymkomplexes an der Oxidation von Sulfit zu Sulfat jedoch ausgeschlossen werden. Zwar führt eine Deletion des Gens *soxY* und das daraus resultierende Fehlen von SoxYZ in der Mutante *Alc. vinosum* Δ *soxY* zu einer im Vergleich zum Wildtyp um 60 % reduzierten Oxidationsrate von extern zugesetztem Sulfit, aber in Mutanten, in denen die Gene *soxX* bzw. *soxBX* mit Hilfe einer Ω -Km-Kassette inaktiviert wurden, ist die Sulfitoxidationsrate der des Wildtyps vergleichbar. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem für den Sox-Multienzymkomplex von *Psc. pantotrophus* *in vitro* nachgewiesenen Substratspektrum. Dieser oxidiert Sulfit zu Sulfat, wobei für diesen Oxidationsschritt nur die Proteine SoxYZ, SoxXA und SoxB notwendig sind (Friedrich *et al.*, 2001). SoxCD, dem in *Pcs. pantotropus* während der Verwertung von Thiosulfat die Funktion der Oxidation eines Sulfanschwefelatoms, das an den konservierten Cysteinrest von SoxY gebunden ist, zu einer Sulfonschwefelgruppe zugeschrieben wird (Bardischewsky *et al.*, 2005) und das im Sox-Multienzymkomplex von *Alc. vinosum* fehlt, ist an diesem Schritt nicht beteiligt (Friedrich *et al.*, 2001). In *Alc. vinosum* ist offensichtlich aber nur SoxYZ an der Oxidation von Sulfit beteiligt. Interessant daran ist, dass SoxYZ keine katalytische Funktion zugesprochen wird, sondern es sich um das Substratbindemolekül des Sox-Multienzymkomplexes handelt (Hensen *et al.*, 2006; Frigaard & Dahl, 2009). Thiosulfat - oder andere reduzierte Schwefelsubstrate - werden kovalent an das Sulfhydryl des Cysteinrestes in einem konservierten C-terminalen GGCGG-Motiv von SoxY gebunden. Dieser Schritt wird normalerweise von SoxXAK katalysiert (Hensen *et al.*, 2006), das aber offensichtlich an der Bindung von Sulfit an SoxYZ nicht beteiligt ist, da eine Inaktivierung von SoxX keine Auswirkungen auf die Sulfitoxidationsrate zeigt. Eine weitere Möglichkeit, wie Sulfit an SoxY gebunden werden könnte, wäre die Bildung eines über Disulfidbrücken

verbundenen SoxZY-S-S-YZSox. Disulfidbrücken reagieren mit Sulfit entsprechend der Gleichung $RS-SR + SO_3^{2-} \leftrightarrow RS^- + RS-SO_3^{2-}$ (Bailey & Cole, 1959; Cecil & Wake, 1962). Eine nachfolgende Hydrolyse von Sulfat mittels SoxB scheidet ebenfalls aus, da Mutante *Alc. vinosum soxBX::Ω-Km* dem Wildtyp vergleichbare Oxidationsraten zeigt. Daher ist mindestens ein weiteres Protein mit redoxaktiven Zentren nötig, um Sulfit zu Sulfat zu oxidieren. Frühere Versuche, in denen *Alc. vinosum*-Wildtyp und die APS-defiziente Mutante *Alc. vinosum D3* mit Wolframat im Medium auf 5 mM Sulfit angezogen wurden, hatten gezeigt, dass dieses die Sulfitoxidation in beiden Kulturen nahezu vollständig inhibiert und bei Wachstum mit 1,5 mM Sulfid wurden 1,1 mM Sulfit als Zwischenprodukt ins Medium ausgeschieden (Dahl, 1996). Bei Wolfram handelt es sich um einen kompetitiven Inhibitor von Molybdän (Giordano *et al.*, 1980), was darauf hindeutet, dass es sich bei dem essentiellen sulfitoxidierenden Enzym in *Alc. vinosum* um ein Molybdoprotein handelt. Naheliegend war hier eine Sulfitdehydrogenase, aber im Genom von *Alc. vinosum* konnten keine Gene identifiziert werden, die für Homologe der gut charakterisierten Sulfitdehydrogenase SorAB aus *Sta. novella* codieren (Christiane Dahl, persönliche Mitteilung). Auch im verwandten *Hlr. halophila* und in verschiedenen grünen Schwefelbakterien finden sich keine Homologen zu SorAB (Frigaard & Dahl, 2009), was den Schluss zulässt, dass die Sulfitoxidation in diesen Organismen auf einem anderen Weg verläuft.

Eine weitere Möglichkeit, die sich mit den Auswirkungen von Wolframat im Medium auf die Oxidation von Sulfit in *Alc. vinosum* in Einklang bringen ließe, wurde von Frigaard & Dahl (2009) vorgeschlagen. Sie zogen die Möglichkeit der Sulfitoxidation durch einen PSRLC3 (Polysulfide-Reductase-Like Complex) in Betracht. Hierbei handelt es sich um einen Komplex, der aus drei Proteinen besteht, die Sequenzähnlichkeiten zu Untereinheiten der Polysulfidreduktase aus *Wolinella succinogenes* aufweisen. Die *Wol. succinogenes* Polysulfidreduktase erlaubt zusammen mit einer Hydrogenase die Polysulfidatmung mit H_2 als Elektronendonator, die zur Produktion von Sulfid führt (Krafft *et al.*, 1992). Sie wird durch die Gene *psrABC* codiert und besteht aus zwei periplasmatischen Untereinheiten, und zwar einer molybdopterinhaltigen PsrA-Untereinheit, einer [4Fe-4S]-Cluster-bindenden PsrB Untereinheit sowie einer in der Membran verankerten PsrC-Untereinheit, die Isoprenoidchinon bindet und Elektronen mit PsrB austauscht (Frigaard & Dahl, 2009). Homologe zur *Wol. succinogenes* Polysulfidreduktase sind auch an der Verwertung von Thiosulfat, Tetrathionat und anderen anorganischen und organischen Verbindungen beteiligt, was zu der Überlegung führt, dass ein solches Homologes auch der Schlüssel zur

Sulfitoxidation in phototrophen Schwefelbakterien sein könnte (Frigaard & Dahl, 2009). Es wurden auch mehrere Homologe zur *Wol. succinogenes* Polysulfidreduktase in den Genomsequenzen von phototrophen Schwefelbakterien gefunden, allerdings wurde bisher keines dieser Enzyme genauer charakterisiert noch für eines von ihnen die Funktion bestimmt (Frigaard & Dahl, 2009).

Im Genom von *Alc. vinosum* finden sich wie bei vielen der grünen Schwefelbakterien und *Hlr. halophila* mehrere polysulfidreduktase-ähnliche Komplexe (AlvinDRAFT_1139, AlvinDRAFT_1140 und AlvinDRAFT_1141; AlvinDRAFT_2148, AlvinDRAFT_2149 und AlvinDRAFT_2150) und zusätzlich noch ein weiteres PsrA-Homologes (AlvinDRAFT_1323) (Christiane Dahl, persönliche Mitteilung). Im ersten Komplex weist das PsrA-Ähnliche eine Tat-Signalsequenz auf und befindet sich damit voraussichtlich wie PsrA in *Wol. succinogenes* im Periplasma. Für das PsrB-Ähnliche findet sich ebenfalls eine Tat-Sequenz, so dass es voraussichtlich ebenfalls im Periplasma lokalisiert ist, während das PsrC-Ähnliche acht Transmembranhelices aufweist. Im Gegensatz dazu sind die PsrAB-Homologen im zweiten Komplex vermutlich cytoplasmatische Proteine, bei PsrC handelt es sich wieder um ein Membranprotein. Auch das zusätzliche PsrA-Homologe ist cytoplasmatisch lokalisiert. Der während der Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen abgelagerte Schwefel wird auf bisher noch unbekanntem Wege wieder mobilisiert und zu Sulfid reduziert, welches dann über die in umgekehrter Richtung arbeitende Sulfitreduktase DsrAB zu Sulfit oxidiert wird (Grimm *et al.*, 2008). Bei DsrAB handelt es sich um ein cytoplasmatisches Protein, so dass die Bildung von Sulfit im Cytoplasma stattfindet (Grimm *et al.*, 2008). Daher scheint es nahe liegend, dass die weitere Oxidation von Sulfit zu Sulfat ebenfalls im Cytoplasma erfolgt. Diese Reaktion könnte von einem polysulfidreduktase-ähnlichen Komplex, dessen aktives Zentrum im Cytoplasma liegt, katalysiert werden. Auch das PsrA-Homologe könnte hier eine Rolle spielen. Allerdings lässt die Tatsache, dass die Deletion von *soxY*, einem Gen, das für ein periplasmatisches Protein codiert, zu einer um 60 % reduzierten Sulfitoxidationsrate führt, die Oxidation von Sulfit im Periplasma nicht völlig abwegig erscheinen. Da es sich bei SoxYZ um ein Substratbindemolekül ohne eigene katalytische Aktivität handelt, wäre es denkbar, dass SoxYZ eventuell sogar über den oben beschriebenen Mechanismus der Heterotetramerbildung Sulfit bindet, welches dann durch einen polysulfidreduktase-ähnlichen Komplex zu Sulfat oxidiert wird, was nur bei einer periplasmatischen Lokalisation der den Molybdäncofaktor enthaltenden Untereinheit möglich wäre und dafür spricht, dass der Komplex aus AlvinDRAFT_1139, AlvinDRAFT_1140 und AlvinDRAFT_1141 in diesem Fall die Sulfitoxidation katalysiert.

Allerdings ließe das eine Komplexbildung von SoxYZ mit der PsrA-Unterheit des Komplexes aus AlvinDRAFT_1139, AlvinDRAFT_1140 und AlvinDRAFT_1141 vermuten, eine solche konnte aber über SPINE nicht nachgewiesen werden. PsrA_1139 hat ein mittels ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) bestimmtes Molekulargewicht von 102909,8 Da, PsrB_1140 von 22980,3 Da. Im Markerbereich von 100 kDa und 23 kDa konnten bei Wachstum von *Alc. vinosum* mit Sulfit als Elektronendonator und der anschließenden Reinigung von SoxYZ nach vorheriger formaldehydvermittelter Verlinkung mit potentiellen Komplexpartnern keine Banden detektiert werden. Zum einen kann das an der Komplexbildung von PsrA_1139 und PsrB_1140 mit PsrC liegen, das in der Membran verankert ist. Bleibt PsrA_1139 fest mit seinen Komplexpartnern verbunden - was durch die Verlinkung mit Formaldehyd noch gefördert wird - wird es sich vermutlich eher in den Zellen als in der Periplasmafraktion finden, die zur Reinigung des Komplexes von SoxYZ mit einem potentiell sulfitoxidierenden Enzym verwendet wurde. Eine Reinigung von SoxYZ-Proteinkomplexen nach Zellaufschluss aus den gesamten Proteingehalt der Zelle war nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Vermutlich lag SoxYZ im Verhältnis zu den anderen Proteinen der Zelle in so kleinen Mengen vor, dass die Bindung an die Säulenmatrix stark behindert wurde. Zum anderen ist es möglich, dass SoxYZ keine über Formaldehyd zu stabilisierenden Komplexe mit seinen Interaktionspartnern bildete. Betrachtet man die Reinigung von SoxYZ nach Verlinkung mit Komplexpartnern mittels Formaldehyd aus *Alc. vinosum*-Kulturen, die mit Thiosulfat als Elektronendonator gewachsen waren, so fällt auf, dass keine Banden von Komplexpartnern gefunden wurden, die Molekulargewichte aufweisen, die denen von SoxB und SoxXAK entsprechen. Zumindest für SoxB konnte aber *in vitro* eindeutig eine Interaktion mit SoxYZ nachgewiesen werden (Welte *et al.*, 2009). Die Aufklärung der Struktur von SoxYZ aus *Pcs. pantotrophus* zeigte, dass sich der konservierte Cysteinrest von SoxY, an den das Substrat gebunden wird, an einem schwingenden Arm befindet, der es ermöglicht, dass es zu den aktiven Zentren verschiedener Partner Zugang bekommt und sich darin entsprechend orientieren kann (Sauvé *et al.*, 2007). Von den Autoren wird zudem vorgeschlagen, dass die Bindung des Substrats an den schwingenden Arm zu besonders kurzlebigen und flüchtigen Komplexen zwischen SoxYZ und seinen Interaktionspartnern führen könnte, was die Umsetzung von Schwefelverbindungen durch den Sox-Multienzymkomplex beschleunigt. Wenn dies der Fall wäre, könnten Komplexe aus SoxYZ und seinen Interaktionspartnern nur sehr schwer nachgewiesen werden. Dagegen konnte ein Protein bei ca. 25 kDa nach der Verlinkung mit Formaldehyd bei Wachstum mit Thiosulfat nachgewiesen werden. Bei dem gefunden Protein könnte es sich um SoxL handeln, das eine vorausgesagte Größe von

24664 Da hat und dem als Funktion das Recycling des Cysteinrestes von SoxY zugeschrieben wird (Hafner, 2007; Welte *et al.*, 2009). Das würde allerdings bedeuten, dass die potentielle Schwefeltransferase SoxL auf andere Art als SoxB und SoxXAK mit SoxYZ interagiert. Was das PsrA- und PsrB-Ähnliche betrifft, so könnte das im Fall einer Interaktion mit SoxYZ bedeuten, dass diese auf die selbe Art und Weise stattfindet wie die zwischen SoxYZ und SoxB und SoxXAK und daher über SPINE nicht nachgewiesen werden kann.

Die sowohl bei Wachstum von *Alc. vinosum* mit Thiosulfat als auch mit Sulfid gefundenen zusätzlichen Banden bei Molekulargewichten die etwas unterhalb denen von SoxYZ liegen, können keinem möglichen Kandidaten für die Sulfidoxidation zugeordnet werden. Für eine neue Art von periplasmatischer Sulfiddehydrogenase erscheinen sie zu klein, da alle bisher bekannten Sulfiddehydrogenasen Molekulargewichte zwischen 42 und 100 kDa aufweisen und die mittleren Molekulargewichte der Molybdänbindedomäne selbst in der Gruppe der sulfidoxidierenden Enzyme, in der diese am meisten reduziert ist, bei 22 bis 25 kDa liegt (Kappler, 2008). Daher wurde auf eine weitere Untersuchung dieser Banden im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

Würde die Oxidation von Sulfid im Periplasma stattfinden, müsste Sulfid nach seiner Bildung im Cytoplasma über die innere Membran ins Periplasma transportiert werden. Wird es im Cytoplasma zu Sulfat oxidiert, wird dieses über die innere Membran transportiert. In *Alc. vinosum* codieren die Gene AlvinDRAFT_2483, AlvinDRAFT_2484, AlvinDRAFT_2485 und AlvinDRAFT_2486 für einen potentiellen Sulfat-ABC-Transporter. Allerdings schließen sie sich direkt an Gene, die für Proteine der assimilatorischen Sulfatreduktion codieren an und das sulfatbindende Protein (AlvinDRAFT_2483) ist periplasmatisch lokalisiert, so dass dieser Transporter vermutlich eher Sulfat ins Cytoplasma transportiert statt umgekehrt. AlvinDRAFT_1615 codiert für eine potentielle Sulfatpermease, die Sulfat aus dem Cytoplasma ins Periplasma transportieren könnte, was für eine Oxidation von Sulfid im Cytoplasma sprechen könnte. In der Literatur wurden mehrere potentielle Sulfid- und Sulfatexporter beschrieben, die einen entsprechenden Transport bewerkstelligen könnten. Es handelt sich dabei zum einen um die Proteine TauZ und SuyZ aus *Pcs. pantotrophus* NKNCYSA (Brüggemann *et al.*, 2004; Rein *et al.*, 2005), zwei potentielle Sulfatexporter. Ein Homologes dieser beiden Proteine findet sich in *Cba. tepidum* TLS in einem sogenannten "sulfur island" (Weinitschke *et al.*, 2007). Zwei potentielle Sulfidexporter sind CuyZ aus *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 (Denger *et al.*, 2006) und TauE aus *Ralstonia eutropha* H16 (Weinitschke *et al.*, 2007). Allerdings ergab eine BLAST-Suche [blastp (protein-protein BLAST) (Altschul *et al.*, 1997; Altschul *et al.*, 2005) für keines dieser vier Proteine ein

Homologes in *Alc. vinosum*, so dass die aus der Genomsequenz hergeleiteten Informationen zum Export von Sulfat oder Sulfit zum jetzigen Zeitpunkt auf Grund von AlvinDRAFT_1615 mehr Hinweise für eine Oxidation von Sulfit im Cytoplasma liefern.

Unabhängig davon, ob eine Polysulfidreduktase oder ein anderes Enzym für die Oxidation von Sulfit in *Alc. vinosum* verantwortlich ist, so scheint dieses auch ohne SoxYZ zu einem gewissen Grad Sulfit oxidieren zu können oder es gibt noch mindestens ein weiteres Protein, das unabhängig von SoxYZ zur Sulfitoxidation in der Lage ist, denn die Deletion von *soxY* führt nicht zu einer vollständigen Inhibierung der Sulfitoxidation, sondern vermindert die Sulfitoxidationsrate lediglich um 60 %. Ausgeschlossen werden kann dabei jedoch die APS-Reduktase, da die gleichzeitige Deletion von *soxY* und die Inaktivierung der Gene für die APS-Reduktase zu keiner weiteren Verminderung der Sulfitoxidation führte.

Bei der Untersuchung der Zellpellets der Mutante *Alc. vinosum* Δ *soxY* bei Wachstum auf 2 mM Sulfid mit Hilfe von XANES-Spektroskopie fällt auf, dass zu keinem Zeitpunkt Sulfit in der Zelle nachgewiesen werden kann. Wird Sulfit beim Fitten der Spektren als Referenzsubstanz angeboten, wird es von WINXAS nicht berücksichtigt, was ein starkes Indiz für das vollständige Fehlen von Sulfit in den Proben darstellt. Das bedeutet, dass Sulfit, wenn es nicht direkt zu Sulfat weiter oxidiert werden kann, sofort aus der Zelle ins Medium ausgeschieden wird. Sulfit ist eine sehr reaktive Verbindung, die in freier Form in der Zelle irreversible Schäden durch die Zerstörung von Disulfidbindungen in Proteinen und Schäden an Basen der DNA verursacht (Kappler, 2008). Das führt offensichtlich dazu, dass auch kleine Mengen freies Sulfit in der Zelle möglichst vollständig vermieden werden sollen. Das könnte auch erklären, warum Sulfit in *Alc. vinosum*-Zellen nie als Zwischenprodukt nachgewiesen werden konnte. Um freies Sulfit in der Zelle zu vermeiden, erfolgt die Oxidation zu Sulfat vermutlich mit der selben Geschwindigkeit wie die Bildung von Sulfit durch DsrAB, so dass kein freies Sulfit als Zwischenprodukt entsteht. Insgesamt bleiben weiterhin viele Fragen bezüglich der Sulfitoxidation in *Alc. vinosum* und anderen Schwefelpurpurbakterien bestehen, die in zukünftigen Arbeiten geklärt werden müssen.

1.2 Regulation der Transkription und Translation der *sox*-Gene in *Alc. vinosum*

Während mittlerweile Sox-Multienzymkomplexe aus mehreren Organismen genauer untersucht und charakterisiert wurden, ist zur Regulation der Transkription und Translation der für den Multienzymkomplex codierenden *sox*-Gene sowohl in chemo- als auch in phototrophen

Organismen bisher wenig bekannt. In *Pcs. pantotrophus* wurde ein als SoxR bezeichneter transkriptionaler Regulator der ArsR-Familie identifiziert, der über ein Helix-turn-Helix-Motiv spezifisch an die jeweilige Region zwischen den Genen *soxS* - *soxV* und *soxW* - *soxX* bindet und als Repressor fungiert (Rother *et al.*, 2005). Eine vergleichbare Situation liegt in *Pab. salicylatoxidans* KCT001 vor (Mandal *et al.*, 2007) Auf Grund der Ergebnisse einer homologen Modellierung der Proteine SigE und ORF1 aus *Sta. novella*, deren Gene sich stromaufwärts der *sox*-Gene befinden, wurde für SigE eine Funktion als Repressor postuliert (Kappler *et al.*, 2001; Bagchi & Ghosh, 2006). Dieser bindet über ein Helix-turn-Helix-Motiv an den Promotor-Bereich und wird durch Interaktion mit ORF1 in Anwesenheit von Schwefelverbindungen wieder von der DNA abgelöst. Allerdings wurde bisher nicht nachgewiesen, ob diese auf Grund homologer Modellierung der Proteinstruktur vermutete Funktion beider Proteine auch *in vivo* vorliegt. Auch für *Thiobacillus denitrificans* wurde im Rahmen einer transkriptionalen Analyse des gesamten Genoms unter aeroben und denitrifizierenden Bedingungen die Expression von *soxXYZA* bestimmt, über die genauen Regulationsmechanismen ist für diesen Organismus aber bisher nichts bekannt (Beller *et al.*, 2006). Im Genom von *Alc. vinosum* wurden weder ein Homologes zu SoxR aus *Pcs. pantotrophus* noch Homologe zu SigE und ORF1 gefunden, so dass die Expression der *sox*-Gene in *Alc. vinosum* auf andere Weise als für *Pcc. pantotrophus* beschrieben und für *Sta. novella* vermutet reguliert werden muss.

Von Friedrich *et al.* (2008) wurde die Anordnung der *sox*-Gene in den Genomen von achtunddreißig verschiedenen chemo- und phototrophen Organismen verglichen. In den meisten der achtunddreißig Organismen liegen die Gene *soxYZXAB* direkt hintereinander und damit vermutlich in einer Transkriptionseinheit. Nur in sechs von ihnen kann eindeutig davon ausgegangen werden, dass sich diese Gene in mehreren Transkriptionseinheiten befinden, da sie in entgegengesetzte Richtung transkribiert werden. Die neu hinzugekommene Genomsequenz von *Hlr. halophila* SL1 zeigt, dass auch in diesem Organismus die *sox*-Gene auf mindestens zwei Transkriptionseinheiten verteilt vorliegen. *Alc. vinosum* ist allerdings der einzige unter den neununddreißig Organismen, in dem die Gene des Sox-Multienzymkomplexes auf drei Transkriptionseinheiten verteilt sind. Nicht alle der sieben Organismen, deren Sox-Komplexe auf mehrere Transkriptionseinheiten verteilt sind, haben Homologe von AlvinDRAFT_0674 und AlvinDRAFT_0675. Diese finden sich nur in *Hlr. halophila*, *Mgc. MC1*, sowie in *Alc. vinosum*, das zwei weitere Homologe von AlvinDRAFT_0674 (AlvinDRAFT_2219 und AlvinDRAFT_2000) und ein Homologes von AlvinDRAFT_0675 (AlvinDRAFT_2979) enthält. Eine Regulation von *sox*-Genen, die auf

mehrere Transkriptionseinheiten verteilt sind, durch AlvinDRAFT_0674- und AlvinDRAFT_0675-Homologe scheint also nicht die Regel zu sein.

Die Untersuchung der Transkription der Gene *soxB*, *soxX* und *soxY* in *Alc. vinosum* mittels quantitativer real-time RT-PCR und die Bestimmung der spezifischen β -Galactosidase-Aktivitäten für die Sox-LacZ-Fusionsproteine zeigte, dass alle drei Gene in Abwesenheit von reduzierten Schwefelverbindungen auf einem niedrigen Level konstitutiv exprimiert wurden. Damit unterschied sich die Expression der *sox*-Gene in *Alc. vinosum* von der in *Pcs. pantotrophus*, in welchem sie nur in Anwesenheit von Schwefelverbindungen exprimiert werden (Friedrich *et al.*, 2001). Sulfid und Thiosulfat induzierten eine Erhöhung der Transkriptionsrate, die bei Wachstum mit Thiosulfat auch auf translationaler Ebene nachweisbar war. Die Expression der *sox*-Gene unterschied sich damit auch von der in *Thb. denitrificans*, in dem *soxXYZA* auf einem hohen Level konstitutiv exprimiert werden, ohne dass die Anwesenheit von Thiosulfat zu einer weiteren Induktion führt (Beller *et al.*, 2006). Bei einem Wachstum mit Sulfit als Elektronendonator blieb die Expression der *sox*-Gene dagegen sowohl auf transkriptionaler als auch auf translationaler Ebene gegenüber photoorganoheterotrophem Wachstum unverändert. Hensen *et al.* (2006) konnte SoxA in der löslichen Fraktion photoorganoheterotroph gewachsener Zellen als schwaches Signal nachweisen, das sich bei photolithoautotrophem Wachstum mit Thiosulfat und Sulfid deutlich verstärkte. Dies deckt sich mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen. Zwar wurde nicht *soxA* sondern *soxX* mittels quantitativer real-time RT-PCR untersucht, aber beide Gene sollten auf vergleichbarem Level exprimiert werden, da sie in einer gemeinsamen Transkriptionseinheit direkt hintereinander liegen und Untereinheiten des selben Proteins sind. Zudem konnte eine niedrige Basisexpression, die in Anwesenheit von Sulfid und Thiosulfat auf ein höheres Transkriptionslevel induziert wird, auch für *soxB* und *soxY* nachgewiesen werden, zu deren Regulation bisher noch keine Untersuchungen durchgeführt wurden.

Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass Sulfid nicht ebenfalls zu einer Induktion der Transkription führt, sondern die erhöhte mRNA-Kopienzahl auf einen sekundären Effekt zurückzuführen ist. Es ist seit langem bekannt, dass *Alc. vinosum* während der Oxidation von Sulfid kleine Mengen Thiosulfat bildet (Stedel *et al.*, 1990). Diese kleinen Mengen Thiosulfat (bis ca. 0,15 mM) könnten zu der beobachteten Steigerung der Expression der *sox*-Gene führen. Wie die Untersuchung der Sox-LacZ-Fusionsproteine in dieser Arbeit gezeigt hat, war die Induktion der *sox*-Gene abhängig von der Thiosulfatkonzentration, was die geringere Erhöhung der mRNA-Kopienzahl bei Wachstum von *Alc. vinosum* mit Sulfid als

Elektronendonator und der damit einhergehenden niedrigeren Thiosulfatkonzentration von etwa 0,15 mM im Vergleich zu 2 mM Thiosulfat, die als alleiniger Elektronendonator eingesetzt wurden, erklären würde. Darauf deuten auch die Ergebnisse der Bestimmung der spezifischen β -Galactosidaseaktivitäten der Sox-LacZ-Fusionsproteine bei Wachstum mit Sulfid hin. Im Gegensatz zur transkriptionalen Ebene, auf der eine deutliche Erhöhung der mRNA-Kopienzahlen in Anwesenheit von Sulfid als Elektronendonator zu finden ist, waren die spezifischen β -Galactosidaseaktivitäten zu denen bei photoorganoheterotrophem Wachstum vergleichbar. Führt das bei Wachstum mit Sulfid in niedrigen Konzentrationen gebildete Thiosulfat zu dem höheren Transkriptionslevel, so ist die daraus resultierende Erhöhung der spezifischen β -Galactosidaseaktivitäten in dem in dieser Arbeit verwendeten Assay kaum zu erkennen, da dieses dafür nicht sensitiv genug ist. Für eine Thiosulfatkonzentration von 0,5 mM wurden spezifische β -Galactosidaseaktivitäten von $10,15 \pm 0,81$ nmol *o*-nitrophenol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ für SoxB-LacZ, $20,02 \pm 3,50$ nmol *o*-nitrophenol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ für SoxX-LacZ und $50,29 \pm 8,18$ nmol *o*-nitrophenol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ für SoxY-LacZ bestimmt. Die Werte für photoorganoheterotrophes Wachstum liegen etwa in dem selben Bereich. Die zu erwartete Konzentration von ca. 0,15 mM Thiosulfat, die bei der Oxidation von Sulfid gebildet wird, würde somit zu Erhöhungen der spezifischen β -Galactosidaseaktivitäten um etwa 3, 6 bzw. 15 nmol *o*-nitrophenol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ für die jeweiligen Fusionsproteine führen. Vergleicht man diese Werte mit den gefundenen Standardabweichungen aller Werte, die mit diesem Assay bestimmt wurden, sieht man, dass die Standardabweichungen teilweise größer waren als die zu erwartende Erhöhung der spezifischen β -Galactosidaseaktivitäten durch so niedrige Thiosulfatkonzentrationen.

Ein direkter, relativer Vergleich zwischen den Ergebnissen, die durch quantitative real-time RT-PCR erhalten wurden, mit der Bestimmung der spezifischen β -Galactosidaseaktivitäten ist auf Grund der verschiedenen Parameter, die bestimmt wurden, nicht möglich, da aber beide Methoden vergleichbare Ergebnisse bei Wachstum mit Malat und Sulfit und eine Erhöhung der jeweiligen Werte bei Wachstum mit Thiosulfat zeigen und auch die Verhältnisse der *sox*-Gene untereinander widerspiegeln, kann davon ausgegangen werden, dass auf translationaler Ebene keine weitere Regulation der *sox*-Gene stattfindet.

Wurden bei photolithoautotrophem Wachstum Sulfid und Thiosulfat gleichzeitig als Elektronendonator eingesetzt, zeigte sich, dass auch Sulfid einen Einfluss auf die Expression der *sox*-Gene in *Alc. vinosum* hatte. Hätte ausschließlich Thiosulfat Auswirkungen auf die Transkription der *sox*-Gene, wäre zu erwarten gewesen, dass sich für *soxB*, *soxX* und *soxY* im Vergleich zu photolithoautotrophem Wachstum mit Thiosulfat als alleinigem

Elektronendonator durch das zusätzlich bei der Sulfidoxidation entstehende Thiosulfat etwas höhere mRNA-Kopienzahlen nachweisen lassen. Das ist allerdings nicht der Fall. Stattdessen ergeben sich für *soxB* und *soxX* Kopienzahlen, die denen bei Wachstum mit Sulfid als alleinigem Elektronendonator vergleichbar sind, während die Kopienzahlen für *soxY* um das dreifache niedriger sind als bei Wachstum mit Sulfid als alleinigem Elektronendonator. Unterstellt man, dass die Induktion der Transkription der Gene *soxB*, *soxX* und *soxY* bei Wachstum mit Sulfid als alleinigem Elektronendonator durch das gebildete Thiosulfat zustande kommt, so könnten die gezeigten Ergebnisse ein Hinweis darauf sein, dass *soxB* und *soxX* nur in Abhängigkeit von Thiosulfat als Reiz reguliert werden, während das regulatorische System von *soxY* davon abweichend sowohl auf Sulfid als auch auf Thiosulfat reagiert - allerdings nur, wenn beide Substrate gleichzeitig vorliegen. Hier scheint aber auch die Thiosulfatkonzentration eine Rolle zu spielen, da auch bei der Oxidation von Sulfid Thiosulfat und Sulfid gleichzeitig vorhanden sind, Thiosulfat aber in deutlich niedrigeren Konzentrationen.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass Sulfid - auch wenn es als alleiniger Elektronendonator vorliegt - zur Erhöhung der Transkriptionsrate der *sox*-Gene führt. In diesem Fall würde die gleichzeitige Anwesenheit von Sulfid und Thiosulfat wie Sulfid eine Erhöhung der Transkription der Gene *soxB* und *soxX* bewirken, die zu der Situation bei Wachstum mit Sulfid als alleinigem Elektronendonator vergleichbar ist, während es auf *soxY* in Kombination mit Thiosulfat als Elektronendonator nur eine deutlich abgeschwächte induzierende Wirkung hat. Insgesamt bleiben diese Ergebnisse zu diesem Zeitpunkt schwer zu interpretieren und erfordern einen detaillierteren Einblick in die Regulation der *sox*-Gene um vollständig verstanden zu werden.

Es bleibt die Frage zu klären, von welcher physiologischen Relevanz die beobachtete geringere Expression von *soxY* in Anwesenheit von Sulfid und Thiosulfat sein könnte. Eine Möglichkeit wäre, dass Sulfid und Thiosulfat ab einem bestimmten Konzentrationsverhältnis zueinander nicht gleichzeitig, sondern hintereinander verwertet werden. Bei gleicher Proteinkonzentration der Kultur benötigt *Alc. vinosum* etwa eine Stunde, um 2 mM Sulfid zu Schwefelkugeln zu oxidieren, während die vollständige Umsetzung von 2 mM Thiosulfat zu 2 mM Sulfat und 2 mM als Schwefelkugeln gespeicherten Schwefels etwa neun Stunden dauert (siehe Ergebnisteil). Beide Reaktionen liefern zwei Elektronen für die Reduktion von NAD^+ . Für *Alc. vinosum* könnte es von Vorteil sein, diese beiden Elektronen schneller zur Verfügung zu haben, weshalb Sulfid als Substrat bevorzugt wird. Es ist denkbar, dass der für die gleichzeitige Anwesenheit von Sulfid und Thiosulfat gezeigte Expressionszustand der *sox*-

Gene zu einer vollständigen Inaktivierung des Sox-Multienzymkomplexes führt, da der unter allen Wachstumsbedingungen gefundene große Unterschied zwischen den mRNA-Kopienzahl der Gene *soxB* und *soxX* einerseits und *soxY* andererseits kaum noch vorhanden ist. Dieser könnte aber von Bedeutung für die Aktivität des Sox-Systems *in vivo* sein. Die Reihenfolge der Verwertung beider Substrate sollte in Fermenterversuchen ermittelt werden. Der Verlauf der Sulfid- und Thiosulfatkonzentrationen in Kulturen, die mit beiden Elektronendonoren gleichzeitig angezogen wurden, wurde mittels HPLC bestimmt, aber diese Daten lieferten keine eindeutige Antwort auf die Frage, ob Sulfid bevorzugt verwertet wird. Da während der Oxidation von Sulfid in *Alc. vinosum* Thiosulfat gebildet wird (Stedel *et al.*, 1990), steigt die Thiosulfatkonzentration während der Oxidation von Sulfid zwar an, aber es ist nicht ausgeschlossen, dass gleichzeitig bereits eine Oxidation des vorhandenen Thiosulfats abläuft, die allerdings langsamer verläuft als die Bildung von Thiosulfat während der Sulfidoxidation. Vergleicht man die mRNA-Kopienzahlen von *soxB*, *soxX* und *soxY*, fällt auf, dass *soxY* unter allen Wachstumsbedingungen deutlich höhere mRNA-Kopienzahlen aufweist als die der anderen beiden Gene. Auch bei den spezifischen β -Galactosidase-Aktivitäten der Sox-LacZ-Fusionsproteine finden sich für SoxY-LacZ deutlich höhere Aktivitäten als für SoxB-LacZ und SoxX-LacZ. Im rekonstituierten Sox-Multienzymkomplex von *Pcs. pantotrophus* führten stöchiometrische Konzentrationen der Proteine SoxYZ, SoxXA, SoxB und SoxCD zu maximaler Aktivität (Friedrich *et al.*, 2000; Rother *et al.*, 2001), was auch für die *in vivo*-Situation sinnvoll erscheint. Wurden die *Pcs. pantotrophus*-Proteine SoxB und SoxYZ durch *Alc. vinosum* SoxB und SoxYZ ersetzt, benötigte man deutlich höhere Konzentrationen von SoxYZ im Vergleich zu SoxXA und SoxB um maximale Aktivität des Hybridenzymassays zu erreichen (Welte *et al.*, 2009). Während von *Pcs. pantotrophus* SoxXA 0,5 μM und von *Alc. vinosum* SoxB 0,05 μM eingesetzt wurden, musste SoxYZ in einer Konzentration von 2,5 μM zugegeben werden. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch *in vivo* höhere Konzentrationen von SoxYZ im Vergleich zu SoxXAK und SoxB für eine maximale Aktivität des Sox-Multienzymkomplexes nötig sind. Allerdings ist es genauso möglich, dass die unterschiedlichen Konzentrationen der Sox-Proteine dadurch bedingt sind, dass es sich um ein Hybridenzymassay aus Proteinen von unterschiedlichen Organismen handelt, die nicht optimal zusammen arbeiten. Dafür spricht auch, dass sich die Konzentrationsabhängigkeit von *Alc. vinosum* SoxYZ in Anwesenheit von *Alc. vinosum* SoxB im Vergleich zu einem Assay mit *Pcs. pantotrophus* SoxB stark verändert und die maximale Aktivität des rekonstituierten Sox-Multienzymkomplexes bereits bei niedrigeren SoxYZ- Konzentrationen erreicht wird (Welte *et al.*, 2009).

SoxYZ könnte auch in größeren Mengen als SoxB und SoxXAK produziert werden, da es als einziges Protein des Sox-Multienzymkomplexes zusätzlich zur Oxidation von Thiosulfat noch für andere Vorgänge in der Zelle benötigt wird. Wie oben beschrieben führte die Deletion von *soxY* zu einer 60 %igen Reduktion der Sulfitoxidationsrate in der Mutante *Alc. vinosum* Δ *soxY*, während die Inaktivierung der Gene *soxB* und *soxX* keine Auswirkung auf die Sulfitoxidation hatte. Obwohl SoxYZ damit eindeutig an der Sulfitoxidation in *Alc. vinosum* beteiligt ist, wird bei Wachstum mit Sulfit als alleinigem Elektronendonator die Transkription von *soxYZ* im Vergleich zu photoorganoheterotrophem Wachstum mit Malat nicht erhöht und auch die spezifischen β -Galactosidaseaktivitäten spiegeln dieses Ergebnis wieder. Sulfit kommt in der Zelle am häufigsten als Zwischenprodukt beim Abbau des intrazellulär gespeicherten Schwefels vor und tritt somit - zwar mit gewisser zeitlicher Verzögerung, da der Abbau der Schwefelkugeln erst nach der vollständigen Oxidation von Sulfid und Thiosulfat zu intrazellulärem Schwefel beginnt - zwangsläufig nach der Oxidation von Sulfid und Thiosulfat auf. Beide Substrate führen zu einer Erhöhung der Transkriptionsraten der Gene des Sox-Multienzymkomplexes und damit auch von SoxYZ. Dieses könnte in größeren Mengen als SoxB und SoxXAK gebildet werden, da es nach der Oxidation von Thiosulfat noch als Substratbindemolekül für ein potentielles sulfitoxidierendes Enzym benötigt wird. Das überschüssig gebildete SoxYZ würde dann sozusagen in einer Warteposition für die zwangsläufig später auftretende Sulfitoxidation bereitstehen, was keine weitere Regulation der Expression von *soxYZ* erforderlich machen würde. Möglich wäre aber auch, dass SoxYZ nicht direkt an der Oxidation von Sulfit beteiligt ist, sondern lediglich als regulatorisches Signal für ein potentielles sulfitoxidierendes Enzym dient. Da der Sox-Multienzymkomplex sowohl für die Oxidation von Thiosulfat als auch für die Oxidation des während der Sulfidoxidation gebildeten Thiosulfats benötigt wird, wäre eines der daran beteiligten Proteine als Signal für die nachfolgende Sulfitoxidation durchaus geeignet. Nimmt man an, dass ein potentielles sulfitoxidierendes Enzym wie der Sox-Multienzymkomplex auf niedrigem Level konstitutiv exprimiert wird, erklärte das auch die in Abwesenheit von SoxYZ verbleibende Sulfitoxidation mit deutlich erniedrigter Oxidationsrate. Auch hier sind zur eindeutigen Klärung der Bedeutung der höheren mRNA-Kopienzahlen von *soxY* im Verhältnis zu *soxB* und *soxX* weitere Einblicke in die Funktionsweise und die physiologische Bedeutung der Sox-Proteine notwendig.

Bei den mRNA-Kopienzahlen für die Mutanten *Alc. vinosum* *soxB:: Ω -Km* und *soxX:: Ω -Km* fällt auf, dass für die Gene *soxB* und *soxX* bei der quantitativen real-time RT-PCR mRNA-Kopien nachgewiesen werden können, obwohl die Transkription dieser Gene durch eine Ω -

Kanamycinkassette unterbunden wurde (Hensen *et al.*, 2006). Auf Grund der Struktur der DNA-Sequenz dieser Gene und der Position der Kanamycinkassetten konnten die Primer nur so gewählt werden, dass sie vor der Stelle liegen, in die die Ω -Kanamycinkassette eingefügt wurde und somit in der quantitativen real-time RT-PCR ein Transkript für das jeweilige Gen erhalten wurde. Da die nachfolgende Ω -Kanamycinkassette aber bereits Auswirkungen auf die Transkription der davorliegenden Gensequenz haben könnte, werden die Gene, die die Ω -Kanamycinkassette enthalten, im Folgenden bei der Bewertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt.

Für Mutante *Alc. vinosum soxB:: Ω -Km* wurde gezeigt, dass sich die Kopienzahlen der *sox*-Gene deutlich von denen des Wildtyps unterscheiden. Sowohl bei photoorganoheterotrophem Wachstum mit Malat als auch bei photolithoautotrophem Wachstum mit Thiosulfat waren die mRNA-Kopienzahlen von *soxX* und *soxY* deutlich größer als die des Wildtyps. Einzige Ausnahme bildete *soxY* bei Wachstum auf Thiosulfat, hier war die Kopienzahl der Mutante geringfügig niedriger als die des Wildtyps. Direkt stromabwärts schließen sich an *soxB* die Gene AlvinDRAFT_0674 und AlvinDRAFT_0675 an, die für eine putative Multisensorhybridhistidinkinase und einen putativen Antwortregulator codieren. Zumindest für AlvinDRAFT_0674 konnte mittels BProm kein eigener Promotor identifiziert werden, so dass das Gen vermutlich in der selben Transkriptionseinheit wie *soxB* liegt. Da die Ω -Kanamycinkassette die Transkription der gesamten Einheit unterbinden sollte, könnten die für die Mutante *Alc. vinosum soxB:: Ω -Km* gefundenen, vom Wildtyp abweichenden Kopienzahlen auf die Inaktivierung der Multisensorhybridhistidinkinase zurückzuführen sein. Ihre Inaktivierung führt dann dazu, dass *soxX* unter photoorganoheterotrophen Bedingungen genauso stark exprimiert wird wie unter photolithoautotrophen Bedingungen. Die mRNA-Kopienzahl liegt dabei in der Mutante deutlich höher als die im Wildtyp bei Wachstum mit Thiosulfat. Es wurde gezeigt, dass die Expression von *soxX* von der Thiosulfatkonzentration abhängig ist. Die Inaktivierung der Multisensorhybridhistidinkinase führt dazu, dass die Expression von *soxX* überhaupt nicht mehr reguliert und damit auf einem Level exprimiert wird, das der maximalen Transkription entspricht, die wiederum deutlich höher liegt als die, die unter den in den Versuchen verwendeten 2 mM Thiosulfat erreicht werden konnte. Für *soxX* scheint es nur einen Regulationsmechanismus zu geben, in dem die Multisensorhybridhistidinkinase die entscheidende Rolle spielt. In Bezug auf *soxY* bewirkt die Inaktivierung der Multisensorhybridhistidinkinase bei photoorganoheterotrophem Wachstum ebenfalls, dass die Expression von *soxY* nicht mehr reprimiert wird. Allerdings erfolgt bei photolithoautotrophem Wachstum mit Thiosulfat weiterhin eine Erhöhung des

Transkriptionslevels, was darauf hindeutet, dass sich hier zwei unabhängige Regulationsmechanismen überlagern: zum einen die Verringerung der Expression in Anwesenheit von Malat, an der die hinter *soxB* liegende Multisensorhybridhistidinkinase beteiligt zu sein scheint und zum anderen die Induktion der Transkription bei Wachstum mit Thiosulfat als Elektronendonator, die von dieser Multisensorhybridhistidinkinase unabhängig erfolgt. Die Regulationsmechanismen für die Transkriptionseinheiten von *soxX* und die von *soxY* scheinen sich voneinander zu unterscheiden. Einen Hinweis dafür liefern auch die unterschiedlichen palindromischen Sequenzen vor den jeweiligen Transkriptionseinheiten, die möglicherweise Erkennungssequenzen für zwei unterschiedliche DNA-bindende Proteine repräsentieren.

Bei der putativen Multisensorhybridhistidinkinase, die in dem stromabwärts von *soxB* liegenden Gen codiert wird, handelt es sich um ein sehr komplexes Protein. Sie besitzt zwei PAS, eine HisKA, eine HATPase_c und zwei REC-Domänen. PAS-Domänen kommen in allen drei Domänen des Lebens vor und treten als Komponenten vieler verschiedener molekularer Systeme wie tagesrhythmischer Uhren, Ionenkanälen und Sensoren für Licht, Sauerstoff, Redoxpotentiale und kleiner Liganden und als Interaktionsdomäne bei Protein-Protein-Wechselwirkungen auf (Pellequer *et al.*, 1999; Taylor & Zhulin, 1999). Obwohl die dreidimensionale Struktur von PAS-Domänen stark konserviert ist, weisen die Primärstrukturen der hunderten von bekannten Proteinen, die PAS-Domänen enthalten, keinen einzigen vollständig konservierten Aminosäurerest auf (Pellequer *et al.*, 1999). Auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzvergleichen zwischen mehreren PAS-Domänen-enthaltenden Multisensorhybridhistidinkinasen wurden im Bereich der Sequenz der PAS-Domänen keine konservierten Aminosäuren gefunden. Laut BLAST sind beide PAS-Domänen im Produkt von AlvinDRAFT_0674 hämhaltig, wobei sie kein für *c*-Typ-Cytochrome typisches CXXCH-Motiv aufweisen. Die Untersuchung der Strukturen verschiedener PAS-Domänen hat ergeben, dass diese trotz der erwähnten geringen Homologie in ihren Primärstrukturen verschiedene Cofaktoren wie Häm, FAD, Flavinmononukleotid und 4-Hydroxymethylsäure über eine gemeinsame α/β -Faltung gebunden haben (Taylor & Zhulin, 1999). Hämhaltige PAS-Domänen wurden bisher vor allem im Zusammenhang mit Sensoren für O₂, CO und NO beschrieben (Gilles-Gonzalez & Gonzalez, 2005). Auf die beiden PAS-Domänen folgen die HisKA- und die HATPase_c-Domäne, die zusammen das Histidinkinasesegment des AlvinDRAFT_0674-Genproduktes bilden (Dutta *et al.*, 1999). Die HisKA-Domäne enthält den zu phosphorylierenden Histidinrest und den Dimerisierungsbereich, während sich in der HATPase_c-Domäne das aktive Zentrum der

Histidinkinase und die ATP-Bindestelle befinden. Diese Anordnung beider Domänen ergibt eine Zuordnung des Genprodukts von AlvinDRAFT_0674 zur Klasse I der Histidinkinasen. In diesen folgen beide Domänen direkt hintereinander der N-terminalen Sensorregion, während sich in Klasse II-Histidinkinasen der zu phosphorylierende Histidinrest getrennt vom katalytischen Zentrum der Histidinkinase am N-Terminus des Proteins befindet (Foussard *et al.*, 2001). Die allermeisten Histidinkinasen weisen in ihrem Histidinkinasesegment eindeutige Signatursequenzen, die sogenannten H-, N-, G1-, F- und G2-Boxen auf (Foussard *et al.*, 2001; Swanson *et al.*, 1994). Diese sind auch im AlvinDRAFT_0674-Genprodukt vorhanden. Das Sequenzalignment mit verschiedenen homologen Hybridhistidinkinasen ergab für die jeweiligen Boxen folgende stark konservierte Sequenzbereiche im Genprodukt von AlvinDRAFT_0674: FLANMSHEIRTPMNA für die am N-Terminus des Histidinkinasesegments liegende H-Box, wobei es sich damit bei His537 um den Histidinrest handeln dürfte, der durch das aktive Zentrum seines Dimerpartners phosphoryliert wird (Dutta *et al.*, 1999), NLXXNAXKFT für die N-Box, die sich wie die anderen drei am C-Terminus des Histidinkinasesegments befindet, DXGIG für die G1-Box, FXXFXQA für die F-Box und GGXGLG für die abschließende G2-Box. Das DXGXG- und das GXG-Motiv flankieren dabei das aktive Zentrum der Histidinkinase (Stock *et al.*, 1989). Die HisKA-Domäne zeigt in manchen Histidinkinasen auch Phosphataseaktivität (Dutta *et al.*, 1999). An das Histidinkinasesegment schließen sich zwei REC-Domänen an. Diese entsprechen den Empfängerdomänen in Antwortregulatoren (Stock *et al.*, 2000). Das Sequenzalignment zeigt für beide Domänen um den jeweiligen Aspartatrest, auf den die Phosphogruppe des Histidinrestes des Kinasesegments übertragen wird, einige konservierte Aminosäuren. Für die erste REC-Domäne, die direkt auf das Histidinkinasesegment folgt sind dies LXVXD und für die zweite REC-Domäne LMDXQMPXXDG, so dass es sich bei Asp779 in REC1 und Asp971 bzw. Asp978 in REC2 um den zu phosphorylierenden Aminosäurerest handeln könnte. In Kombination mit den beiden PAS-Domänen des Genprodukts von AlvinDRAFT_0674 könnten die beiden REC-Domänen darauf hindeuten, dass die Multisensorhybridhistidinkinase in der Lage ist, zwei verschiedene Signale zu detektieren und in eine entsprechende regulatorische Antwort umzusetzen. Von Taylor & Zhulin (1999) wurde bereits die Vermutung geäußert, dass mehrere PAS-Domänen zur Registrierung mehrerer Signale in einem Protein genutzt werden könnten, in der Literatur ist meines Wissens aber bisher kein entsprechendes Beispiel bekannt. In Hybridsensorhistidinkinasen wird die Phosphatgruppe des Aspartatrestes in der Regel weiter auf einen Histidinrest in einer HPt-Domäne am C-Terminus des Proteins übertragen, von welchem sie dann auf den

Aspartatrest des zugehörigen Antwortregulators transferiert wird (Stock *et al.*, 2000) Ein unspezifischer Treffer in der BLAST-Suche gibt einen Hinweis auf eine solche Domäne im Genprodukt von AlvinDRAFT_0674 und das Sequenzalignment ergibt in diesem Bereich eine konservierte Region mit der Aminosäuresequenz HTXKG, so dass es sich bei His1112 um den finalen Akzeptor der Phosphatgruppe im Genprodukt von AlvinDRAFT_0674 handeln könnte. Eindeutigere Hypothesen zur Funktion der in der Transkriptionseinheit von *soxB* liegenden Multisensorhybridhistidinkinase können trotz der Sequenzvergleiche zu diesem Zeitpunkt nicht gemacht werden, da die im Protein enthaltenen PAS-Domänen als Sensor für mehrere verschiedene Signale dienen können. Auf Grund der postulierten Hämgruppen, die die PAS-Domänen enthalten und der Beteiligung der Multisensorhybridhistidinkinase an der Regulation der Transkription der *sox*-Gene unter unverändert anaeroben Bedingungen, erscheint es wahrscheinlich, dass es sich hierbei um einen Redoxsensor handelt. Aber auch kleine, im Cytoplasma vorliegende Liganden sind als Signal denkbar. Für die Bildung einer Protein-Protein-Interaktionsdomäne fehlen den beiden PAS-Domänen das dafür übliche bHLH-Motiv (Taylor & Zhulin, 1999).

Einen möglichen Partner der putativen Multisensorhybridhistidinkinase in einem Zwei-Komponentensystem stellt das Produkt des direkt stromabwärts liegenden Gens AlvinDRAFT_0675 dar, bei dem es sich um einen putativen Antwortregulator handelt. Das Protein weist an seinem N-terminalen Ende eine REC-Domäne auf. Das Sequenzalignment ergibt für den Abschnitt der Domäne einen konservierten Bereich mit der Sequenz PDLXLXD, so dass es sich bei Asp52 oder Asp57 um den Aspartatrest, auf den die Phosphorylgruppe der Multisensorhybridhistidinkinase übertragen wird handeln könnte. Katalysiert wird der Transfer vermutlich vom aktiven Zentrum des Antwortregulators (Foussard *et al.*, 2001). Die am C-Terminus des Proteins befindliche GGDEF-Domäne deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung des Aspartatrestes zu einer Diguanylatcyclaseaktivität des Genprodukts von AlvinDRAFT_0675 führt (Galperin *et al.*, 2001). Diguanylatcyclasen katalysieren die Verbindung von zwei cGMP-Molekülen zu c-diGMP, einem prokaryotischen "second messenger" der bisher im Zusammenhang mit der Regulation der Zelldifferenzierung und Mobilität in *Caulobacter crescentus* und der Cellulosebiosynthese in *Gluconoacetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens* und *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben wurde (Galperin *et al.*, 2001; Jenal, 2004; Römling *et al.*, 2005; Römling & Amikam, 2006; Lee *et al.*, 2007). Zahlreiche Proteine mit GGDEF-Domäne besitzen zusätzlich auch eine EAL-Domäne, die Diguanylatphosphodiesteraseaktivität zeigt und zusammen mit der Diguanylatcyclase den c-diGMP-Spiegel der Zelle reguliert (Simm *et al.*, 2004). Im

Genprodukt von AlvinDRAFT_0675 fehlt eine solche EAL-Domäne. Entweder wird diese Funktion von einem anderen Protein, dessen Gen nicht in der Nähe der *sox*-Gene codiert ist, übernommen oder die Regulation des c-diGMP-Spiegels erfolgt über die Regulation der Transkription von AlvinDRAFT_0675. Hierfür spricht, dass AlvinDRAFT_0675 nicht in der selben Transkriptionseinheit wie *soxB* und die Multisensorhybridhistidinkinase liegt, sondern einen potentiellen eigenen Promotor besitzt. Für die Regulation der Expression der *sox*-Gene bedeutet die potentielle Diguanylatphosphocyclaseaktivität des stromabwärts von *soxB* gelegenen Regulators, dass weitere Komponenten daran beteiligt sind, für die bisher noch keine geeigneten Kandidaten im Genom von *Alc. vinosum* identifiziert werden konnten. Vermutlich handelt es sich dabei um Proteine mit Helix-turn-Helix-Motiven mit einem Rezeptor für c-diGMP, die spezifisch an die Promotorbereiche der *sox*-Gene binden können. Entsprechende palindromische Sequenzen, die als DNA-Bindestelle dienen könnten, wurden sowohl in der Zwischenregion von *soxB* und *soxX*, als auch vor *soxY* und AlvinDRAFT_0674 identifiziert. Allerdings können die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse nicht eindeutig eine Regulation der *sox*-Gene durch die Genprodukte von AlvinDRAFT_0674 und AlvinDRAFT_0675 beweisen, da nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei den Unterschieden im Vergleich zum Wildtyp nur um sekundäre Effekte handelt, die durch das Fehlen von SoxB im Sox-Multienzymkomplex hervorgerufen werden. So wäre zum Beispiel auch denkbar, dass ein Zwischen- oder Nebenprodukt der durch den Komplex katalysierten Reaktionen als Signal für die Regulation der Expression der *sox*-Gene dient, dessen Fehlen auf Grund der Inaktivierung von *soxB* zu den beobachteten Ergebnissen führte. Ob AlvinDRAFT_0675 in *Alc. vinosum soxB::Ω-Km* durch die Insertion der Ω-Kanamycinkassette tatsächlich ebenfalls vollständig inaktiviert ist, konnte nicht nachgewiesen werden.

Entsprechendes gilt für die Ergebnisse der Mutante *Alc. vinosum soxX::Ω-Km*, wobei hier auch noch größere Unsicherheit darüber herrscht, welche Gene die Transkriptionseinheit, in der *soxX* liegt, tatsächlich umfasst und welche Gene damit von stromabwärts gerichteten Effekten der Ω-Kanamycinkassette betroffen sein können. Das betrifft in besonderem Maße die Gene der Cytochrombiosynthese, die sich an die *sox*-Gene anschließen (Hensen *et al.*, 2006). Die Unterschiede in den Kopienzahlen von *soxB* liegen sowohl bei Wachstum auf Malat als auch bei Wachstum mit Thiosulfat in den Bereichen der Standardabweichungen der bestimmten Werte, so dass sich in Bezug auf dieses Gen keine Veränderungen in der Expression im Vergleich zum Wildtyp ergeben. Das Gen *soxY* wird in der Mutante dagegen bei Wachstum mit Malat wieder deutlich höher exprimiert als im Wildtyp, während bei

Wachstum mit Thiosulfat die Kopienzahlen niedriger sind als die des Wildtyps. Das selbe Bild ergab sich bereits für die Mutante *Alc. vinosum soxB::Ω-Km*, wobei auch die Kopienzahlen für *soxY* unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen im selben Bereich liegen. Das deutet darauf hin, dass das Fehlen eines der anderen Sox-Proteine im Sox-Multienzymsystem zu dieser Veränderung in der Expression von *soxY* führt, was auch Rückschlüsse aus den quantitativen real-time RT-PCR-Ergebnissen der Mutante *Alc. vinosum soxB::Ω-Km* über die möglichen Auswirkungen der Multisensorhybridhistidinkinase auf die Regulation von *soxY* sehr unsicher macht. Die bisherigen Ergebnisse lassen also nur eine Regulation von *soxX* durch das Genprodukt von AlvinDRAFT_0675 einigermaßen wahrscheinlich erscheinen, da sich die RNA-Kopienzahlen für *soxX* in beiden Mutanten deutlich unterscheiden. Das Fehlen von *soxY* hat keine Auswirkungen auf die Expression von *soxB* und *soxX*.

2 Untersuchungen zur Verwertung von Elementarschwefel durch *Alc. vinosum* und andere Schwefelpurpurbakterien

2.1 Einfluss der Schwefelspeziation auf die Verwertung von Elementarschwefel

In den letzten Jahren wurden einige Untersuchungen zur Verwertung von Elementarschwefel mit dem Schwerpunkt auf verschiedene Thiobacilli veröffentlicht (z.B. Baldensperger *et al.*, 1974; Espejo & Romero, 1987; Pronk *et al.*, 1992; Ramírez *et al.*, 2004). Die Schwefelspeziation als möglicher Parameter der Schwefelaufnahme wurde dabei aber bisher kaum beachtet. Unter den veröffentlichten Studien finden sich nur zwei, die die Speziation des Elementarschwefels bei der Aufnahme berücksichtigen. Laishley *et al.*, (1986) untersuchten den Effekt der molekularen Zusammensetzung verschiedener Elementarschwefelformen (reiner S_{μ} , reiner S_8 und einer Mischung aus beiden und einer anderen Schwefelspezies S_x) auf die Oxidation von Schwefel durch *Acidithiobacillus albertensis* (früher *Thiobacillus albertis*; Kelly & Wood, 2000) unter aeroben Bedingungen. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Oxidation von Elementarschwefel mehr von der kristallinen Mikrostruktur als von der spezifischen molekularen Zusammensetzung abhängt. In Anlehnung an diese Experimente untersuchten Blight *et al.* (2009) die Verwertung von verschiedenen Schwefelallotropen durch eine heterogene Kultur aus acidophilen

Schwefeloxidierern. Diese bevorzugten eindeutig *cyclo*-Octaschwefel und waren nicht in der Lage, Polymerschwefel zu verwerten.

Die Beobachtung, dass *Alc. vinosum* und *Thiocapsa roseopersicina* nur Polymerschwefel verwerten können - oder ihn zumindest stark bevorzugen - steht im Kontrast zu den Ergebnissen von Laishley *et al.* (1986) und Blight *et al.* (2009). Sowohl bei *Atb. albertensis* als auch bei der untersuchten heterogenen Kultur handelte es sich um aerobe, chemotrophe Schwefeloxidierer, die bei niedrigem pH-Wert wachsen, so dass Unterschiede in der Elementarschwefelverwertung zu Schwefelpurpurbakterien durchaus denkbar sind. Während *Atb. albertensis* mehr durch die kristalline Mikrostruktur des Schwefels als durch seine spezifische molekulare Zusammensetzung beeinflusst wird (Laishley *et al.*, 1986), scheint die Fähigkeit, Elementarschwefel aufzunehmen sowohl in der heterogenen Kultur von Blight *et al.* (2009) als auch in den phototrophen Bakterien *Alc. vinosum* und *Tca. roseopersicina* völlig von der Schwefelspeziation abzuhängen.

Für die untersuchten Angehörigen der *Ectothiorhodospiraceae* waren die Ergebnisse nicht ganz so klar wie für die *Chromatiaceae*. In den Kulturen von *Hlr. halophila* wurden nur 25 % der erwarteten 50 mM Sulfat und selbst nach 408 h mittels XANES-Spektroskopie noch immer 41 % Polymerschwefel in den verbliebenen Schwefelplättchen nachgewiesen. Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen: Entweder wurde die Polymerschwefelfraktion des zugegebenen Elementarschwefels nicht vollständig aufgenommen, oder die daraus gebildeten Schwefelkugeln wurden nicht vollständig zu Sulfat oxidiert. Die extrazellulären Schwefelkugeln von *Hlr. halophila* bestehen aus Polymerschwefel (Prange *et al.*, 2002a), was einen höheren Polymerschwefelgehalt des in der Kultur verbliebenen Schwefels vorgeben würde. Nach 408 h waren tatsächlich unter dem Mikroskop noch deutlich Schwefelkugeln zu erkennen. Unterstellt man, dass *Hlr. halophila* ebenfalls nur Polymerschwefel verwerten kann, sollten noch 43 % als Polymerschwefel in Form von Schwefelkugeln in der Kultur vorhanden sein, da 25 % des zugegebenen Schwefels bereits zu Sulfat oxidiert wurden. Das entspricht nahezu genau dem 41 %igen Anteil, den Polymerschwefel an den XANES-Spektren der verbleibenden Schwefelplättchen hat. Daraus lässt sich schließen, dass auch *Hlr. halophila* nur Polymerschwefel verwerten kann oder diesen zumindest *cyclo*-Oktaschwefel gegenüber stark bevorzugt.

Auch in den nach 240 h untersuchten Schwefelplättchen aus *Hlr. abdelmalekii*-Kulturen findet sich noch ein signifikanter Anteil von 42 % Polymerschwefel. Das ist insofern interessant, da *Hlr. abdelmalekii* die gebildeten Schwefelkugeln nicht weiter zu Sulfat oxidieren kann (Then & Trüper, 1983). Würde der Organismus den zugegebenen

Elementarschwefel lediglich zu extrazellulären Schwefelkugeln, die auch bei *Hlr. abdelmalekii* aus Schwefelketten bestehen (Prange *et al.*, 2002a) umsetzen, wäre es nur anhand der Zusammensetzung des verbleibenden Schwefels möglich, zu erkennen, ob er ausschließlich Polymerschwefel aufnimmt oder auch *cyclo*-Oktaschwefel verwerten kann. Im ersteren Fall hätte der in der Kultur verbleibende Schwefel die selbe Zusammensetzung wie der zugegebenen Schwefel, da der Polymerschwefelanteil in aus Polymerschwefel bestehende Schwefelkugeln umgesetzt würde. Im zweiten Fall würde der in der Kultur verbleibende Schwefel vollständig aus Polymerschwefel bestehen, da dann auch der *cyclo*-Oktaschwefelanteil des zugegebenen Elementarschwefels in aus Polymerschwefel bestehende Schwefelkugeln umgesetzt würde. Beides war aber in den untersuchten *Hlr. halophila*-Kulturen nicht der Fall. Im verbliebenen Schwefel ist der Polymerschwefelanteil deutlich gesunken, was darauf hindeutet, dass die gebildeten Schwefelkugeln wieder abgebaut und weiter verstoffwechselt werden. Allerdings ist bisher völlig unbekannt, auf welchem Wege und zu welchem Endprodukt, da Sulfat in den Kulturen nicht nachgewiesen werden konnte. Hier sind in der Zukunft weitere Untersuchungen zur Physiologie des Organismus erforderlich. Es erscheint aus energetischer Sicht aber durchaus sinnvoll, dass *Hlr. abdelmalekii* in der Lage ist, die aus Elementarschwefel gebildeten Schwefelkugeln weiter zu verwerten, da die Umsetzung von externem Elementarschwefel in Schwefelkugeln keine Elektronen liefert und somit energetisch neutral ist. Das starke Wachstum von *Hlr. abdelmalekii* in Anwesenheit von Elementarschwefel ist allerdings nur teilweise auf dessen Verwertung zurück zu führen, da der Organismus nur mixotroph mit Acetat angezogen werden kann. Die aus dem Fitten der XANES-Spektren der verbliebenen Schwefelplättchen erhaltenen Ergebnisse deuten allerdings auch für *Hlr. abdelmalekii* darauf hin, dass der Organismus Polymerschwefel stark bevorzugt, da die Polymerschwefelfraktion im Verhältnis zum *cyclo*-Oktaschwefelanteil stark abnimmt.

Auf Grundlage der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse für *Alc. vinosum*, *Tca. roseopersicina*, *Hlr. halophila* und *Hlr. abdelmalekii* zeigt sich, dass es Mikroorganismen gibt, die nur den kettenförmigen Polymerschwefel verwerten können. Diese These unterstützen auch die Ergebnisse von Urich *et al.* (2006), die den Einfluss verschiedener Schwefelspezies auf die enzymatische Funktion der Schwefeloxigenase-reduktase des thermophilen Archaeons *Acidianus ambivalens* untersucht haben. Theoretische Überlegungen, die auf der Kristallstruktur dieses Enzyms basieren, führten zu der Hypothese, dass nur lineare und nicht zyklische Schwefelspezies als Substrat für dieses Enzym in Frage kommen. Zudem bestehen die Schwefelkugeln der vier untersuchten Schwefelpurpurbakterien

ausschließlich aus Schwefelketten (Mono-bis-organylsulfanen) (Prange *et al.*, 2002a), so dass es so scheint, als könnten die Organismus den chemisch stabileren *cyclo*-Oktaschwefel überhaupt nicht nutzen - weder innerhalb noch außerhalb der Zelle. Insgesamt lassen sich Schwefeloxidierer damit in drei Gruppen aufteilen: Eine Gruppe enthält Organismen, die ausschließlich Polymerschwefel verwerten können, wobei bisher nur anaerobe, phototrophe Schwefeloxidierer in diese Gruppe fallen. Zu einer zweiten Gruppe gehören Organismen, die ausschließlich *cyclo*-Oktaschwefel nutzen. Es handelt sich um aerobe, acidophile Schwefeloxidierer, deren Gattungen und Arten bisher noch nicht identifiziert wurden. Eine dritte Gruppe stellt *Atb. albertensis* dar, der sowohl Polymer- als auch *cyclo*-Oktaschwefel nutzen kann.

Die Verwendung von XANES-Spektroskopie zur Bestimmung des Einflusses der Schwefelspeziation auf die Verwertung von Elementarschwefel wurde durch George *et al.* (2008) stark kritisiert. Die Autoren sind der Meinung, dass es nicht möglich ist, mittels XANES-Spektroskopie im Transmissionsmodus zwischen *cyclo*-Oktaschwefel und Polymerschwefel zu unterscheiden und die beobachteten Effekte auf Spektren, die durch experimentelle Artefakte, die auf die Partikelgröße der Schwefelproben und die Unmöglichkeit, solche Proben für diesen Messmodus adäquat zu präparieren, zurückzuführen sind, deformiert wurden, beruhen. Im Transmissionsmodus aufgenommene Spektren waren die Basis für die Analyse der Schwefelkugeln verschiedener mikrobieller Spezies und Gattungen bezüglich ihrer chemischen Speziation, insbesondere dem Verhältnis zwischen Polymerschwefel und *cyclo*-Oktaschwefel (z.B. Prange *et al.*, 1999; Prange *et al.*, 2002a). Auch wenn die von George *et al.* (2008) beschriebenen methodischen Probleme tatsächlich vorhanden sind und ernsthaft berücksichtigt werden müssen, finden sich in der Literatur experimentelle Daten, die die Ergebnisse, die mit Hilfe der in dieser Arbeit beschriebenen Analysemethoden erzielt wurden, unterstützen. Chauvistré *et al.* (1992) untersuchte zum Beispiel mittels XANES-Spektroskopie die *in situ*-Vulkanisation von Gummi. Bei diesen Proben spielt die Korngröße auf Grund der niedrigen Schwefelkonzentration keine Rolle. Die Autoren beobachteten dabei in ihren Spektren die Öffnung des *cyclo*-Oktarings, die zu 'polymerem' Schwefel führt, einem Prozess, der in der Gummiindustrie gut beschrieben ist. Durand *et al.* (1996) bestimmten direkt die Schwefel-K-Kanten-XANES-Spektren von zyklischem und polymerem Schwefel, wobei sie den Nachweis der entstandenen Elektronen zur Detektion benutzten. Diese Technik ist kaum empfindlich gegenüber einer spezifischen Präparation der Proben. Die Autoren beobachteten ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den beiden allotropen Formen. Beide Arbeiten sprechen dafür, dass es möglich ist, mittels

XANES-Spektroskopie, zwischen *cyclo*-Oktaschwefel und Polymerschwefel zu unterscheiden. Auf diesem Gebiet werden momentan auch weitere Experimente durchgeführt, deren Publikation helfen soll, weitere Klärung im wissenschaftlichen Disput der beiden Arbeitsgruppen zu bringen (Alexander Prange, persönliche Mitteilung).

Zudem sind George *et al.* (2008) der Meinung, dass die Partikelgröße des zugegebenen Schwefels auch erklärt, dass *Alc. vinosum* den zugegebenen Elementarschwefel nur teilweise verwertet. Gegen diese Theorie sprechen die Wachstumsversuche mit *Alc. vinosum*, in denen reiner Polymerschwefel als Elektronendonator zugegeben wurde. Dieser Schwefel unterschied sich in den Partikelgrößen nicht von den anderen eingesetzten Elementarschwefeln S1 und S2, wurde aber im Gegensatz zu diesen vollständig verwertet. Das macht die Partikelgröße als einzigen Parameter für die teilweise Nutzung des Elementarschwefels durch *Alc. vinosum* unwahrscheinlich und spricht für den Einfluss der Schwefelspeziation auf die Verwertung von Elementarschwefel in phototrophen Schwefelpurpurbakterien.

2.2 Mobilisierung von Elementarschwefel

Es konnte auch eine weitere Anwendung für die XANES-Spektroskopie zur qualitativen Identifizierung wasserlöslicher Schwefelverbindungen in Erweiterung der bisher verwendeten HPLC-Analyse nach Rethmeier *et al.* (1997) gezeigt werden - allerdings mit der Einschränkung, dass Sulfid mittels XANES-Spektroskopie nicht nachgewiesen werden konnte. Die Untersuchung der Proben unter anoxischen Bedingungen zeigte, dass keine Oxidation des Sulfid in Anwesenheit von Luftsauerstoff zu höher oxidierten Verbindungen stattfand, da Sulfid auch in diesen Proben nicht nachweisbar war. Natriumsulfid wird in wässriger Lösung protoniert und bildet dabei flüchtiges Hydrogensulfid H₂S (Siedepunkt = -60,33 °C, pK_a = 6,89). Demzufolge geht Sulfid vermutlich während der Probenpräparation und des Transportes zur Synchrotronquelle vollständig als Hydrogensulfid aus. Die Stickstoff- und/ oder Heliumatmosphäre, die während der Präparation der Proben für die XANES-Messungen benötigt wird, hat vermutlich zusätzlich zu diesem Effekt beigetragen. In einer früheren Arbeit wurde von Prange (2008) das XANES-Spektrum einer Sulfidlösung gemessen. Allerdings enthielt die untersuchte 'Futterlösung' deutlich höhere Sulfidkonzentrationen als die in dieser Arbeit analysierten Kulturüberstände, so dass Verluste in Form von Hydrogensulfid in ersterem Fall nicht ins Gewicht fielen, während sie im zweiten Fall zu dem beobachteten drastischen Effekt führten. Bei der Bestimmung der Sulfidkonzentrationen mittels HPLC gehen nur Spuren von Sulfid als Hydrogensulfid

verloren, da die Proben unmittelbar mit Monobromobiman, einem fluorezierenden Reagenz zur Markierung von Thiolgruppen, derivatisiert werden. Das stellt für die Identifizierung und Bestimmung von Sulfid in Überstandsproben einen offensichtlichen und unverzichtbaren Vorteil dar.

Ob die bei der Oxidation von Sulfid mittels HPLC nachgewiesenen Polysulfide auch in den XANES-Spektren der Kulturüberstände identifiziert werden können, ist nicht völlig klar. Die in *Alc. vinosum* nachgewiesenen Polysulfide sind nicht näher charakterisiert, daher gibt es weder für den Nachweis mit HPLC noch für das Fitten entsprechender XANES-Spektren geeignete Referenzsubstanzen. Zu Polysulfiden mit der Struktur S_n^{2-} tragen spektrale Strukturen von S-S-Bindungen bei, deren Existenz durch die Berücksichtigung von Cystin beim Fitten des 15 min-Spektrums bei Wachstum auf Sulfid eindeutig nachgewiesen werden konnte. Da Polysulfide von *Alc. vinosum* zügig als Substrat genutzt werden, sind nach diesem Zeitpunkt auch keine Polysulfide mehr per HPLC nachweisbar und entsprechend liefert Cystin beim Fitten der Spektren, die zu späteren Zeitpunkten aufgenommen wurden, keinen signifikanten Beitrag mehr. Auch während der ersten drei Überstandsproben der Oxidation von Thiosulfat, bei der Polysulfide nicht auftreten, sind keine S-S-Bindungen nachzuweisen. Es ist nicht auszuschließen, dass zu dem spektralen Merkmal der S-S-Bindung, die über Cystin beim Fitten berücksichtigt wurde, auch S-S-Bindungen aus Polysulfiden beitragen auch wenn diese keine C-S-Bindungen aufweisen, da Cystin die einzige Referenz in dem hier verwendeten Satz ist, die S-S-Bindungen berücksichtigt. Ohne besser geeignete Referenzsubstanzen für die in *Alc. vinosum* vorkommenden Polysulfide ist es hier nicht möglich, eindeutig zu entscheiden, ob in den Überständen Polysulfide vorliegen oder nicht. Diese Problematik macht auch der 48 h-Überstand bei Wachstum mit Thiosulfat deutlich. In dieser Probe können eindeutig signifikante Anteile von S-S-Bindungen nachgewiesen werden, die aber nicht von Polysulfiden stammen können, da die HPLC-Analyse keinen Hinweis auf Polysulfide liefert.

Es wäre auch denkbar, dass es sich bei den gefundenen thiolischen und disulfidischen Komponenten um oxidierte und reduzierte Disulfidbrücken aus Proteinen lysierter Zellen handelt. Darauf deuten möglicherweise auch die für Wachstum mit Sulfid und Thiosulfat erhaltenen Ergebnisse hin. In den untersuchten Überständen aus diesen Proben lagen fast ausschließlich C-S-H-Spezies vor, was auf eine Reduktion von Disulfidbrücken in Anwesenheit der Reduktionsmittel Sulfid und Thiosulfat hindeuten könnte. Interessant sind die disulfidischen Komponenten vor allem im Zusammenhang mit der Aufnahme von Elementarschwefel. Sie treten nach 3 h, also zu dem Zeitpunkt, an dem die

Schwefelaufnahme in *Alc. vinosum* begonnen hat, zum ersten Mal auf und bleiben auch in den nachfolgenden Proben bestehen. Bei Wachstum mit diesem Substrat kann allerdings ausgeschlossen werden, dass es sich um Polysulfide handelt, da bei den HPLC-Analysen keine Polysulfide nachweisbar waren. Allerdings ist denkbar, dass eine andere disulfidische Komponente in die Mobilisierung von Elementarschwefel involviert ist. Für acidophile Bakterien wurden Persulfide (R-SS_n-H) als Produkt der Schwefelmobilisierung vorgeschlagen (Rohwerder & Sand, 2007). Auch bei diesen handelt es sich um eine Komponente mit S-S-Bindungen, die auf Grund der vorliegenden Fitergebnisse nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Hier ist eine weitere Klärung notwendig.

Die vergleichenden Messungen von Proben, die unter oxischen und anoxischen Bedingungen präpariert wurden, zeigten, dass Luftsauerstoff keinen Einfluss auf die Schwefelspeziation der Kulturüberstände hat und diese Proben somit unter den experimentell deutlich weniger aufwendigen oxischen Bedingungen gemessen werden können. Zwar zeigen sich kleine Unterschiede zwischen den jeweiligen Proben, aber diese sind vermutlich der Tatsache geschuldet, dass es notwendig war, zwei verschiedene Sätze *Alc. vinosum* Δ soxY-Kulturen für die Probennahme unter den beiden verschiedenen Bedingungen zu verwenden. Die einzelnen Kulturen zeigen zwar vergleichbares Wachstum, sie sind aber nie vollständig identisch. Diese kleinen Unterschiede im Wachstum führen zu den Differenzen in den prozentualen Beiträgen zwischen den oxischen und anoxischen Proben.

Die Anwendung der Methode auf Überstände aus *Alc. vinosum*-Kulturen die mit Elementarschwefel, Sulfid oder Thiosulfat als Elektronendonator gewachsen waren, zeigte, dass sich in diesen thiolische und disulfidische Komponenten sowie Sulfone und Sulfonate finden. Allerdings tritt keine dieser Verbindungen spezifisch bei Wachstum mit Elementarschwefel auf, was die Überlegung unwahrscheinlich macht, dass eine der neuen detektierten Verbindungen für die Mobilisierung dieses wasserunlöslichen Substrates verantwortlich ist. Das Vorkommen dieser Schwefelverbindungen für sich genommen ist allerdings interessant, kann aber kaum mit den momentanen Modellen für die Oxidation von Schwefelverbindungen in phototrophen Bakterien in Einklang gebracht werden (Frigaard & Dahl, 2009). Rolle und Ursprung dieser Verbindungen müssen zukünftig erst geklärt werden, wobei durchaus denkbar ist, dass die in den Überständen gefundenen Schwefelverbindungen nicht direkt mit dem Stoffwechsel reduzierter Schwefelverbindungen in Zusammenhang stehen.

Auch wenn es sich bei den bei Wachstum von *Alc. vinosum* mit Elementarschwefel gefundenen C-S-S-C-Spezies um eine lösliche disulfidische Komponente der Schwefelmobilisierung handeln könnte, so bewirkt diese keine Schwefelmobilisierung in

Distanz zur Zelle. Hierfür ist ein enger Zell-Schwefelkontakt notwendig. Auch die beiden anderen untersuchten Schwefelpurpurbakterien *Tca. roseopersicina* und *Hlr. halophila* konnten Elementarschwefel nur verwerten, wenn ein direkter Kontakt zwischen Zelle und Schwefelpartikel möglich war. Die Notwendigkeit von direktem Zell-Schwefelkontakt wurde auch für einige *Thiobacilli* beschrieben (Schaeffer *et al.*, 1963; Bryant *et al.*, 1984; Espejo & Romero, 1987) und auch das grüne Schwefelbakterium *Pch. vibrioformis* benötigt direkten Kontakt zwischen Zelle und Substrat, um Elementarschwefel verwerten zu können (siehe bei Franz *et al.*, 2007). Interessant ist dabei, dass sich bei *Pch. vibrioformis* Sulfid als wasserlösliches Intermediat der Elementarschwefelverwertung findet (Borkenstein & Fischer, 2006), welches eher vermuten ließe, dass eine sulfidvermittelte Schwefelaufnahme keinen direkten Kontakt zwischen Schwefel und Zelle benötigt. Hier herrscht meines Erachtens ein gewisser Widerspruch zwischen den momentan in der Literatur verfügbaren Ergebnissen, dessen Aufklärung noch aussteht. Der molekulare Mechanismus, der hinter der Etablierung des Zell-Schwefelkontaktes und in den *Chromatiaceae* der Aufnahme des Schwefels in die Zelle steckt, ist bisher völlig unbekannt. Es gibt nur einige wenige Studien zum Adhensionsmechanismus von chemotrophen Schwefeloxidierern in der Literatur. So fanden Ohmura *et al.* (1996) und Ramírez *et al.* (2004) Hinweise auf ein Protein der äußeren Membran von *Atb. ferrooxidans*, das vermutlich an der Adhesion der Zelle an Elementarschwefel beteiligt ist. Bei der Untersuchung der Proteine der äußeren Membran von *Alc. vinosum* wurde dagegen kein Protein gefunden, das spezifisch bei Wachstum mit Elementarschwefel als Elektronendonator produziert wurde. Mit zwei verschiedenen Solubilisierungsgenzien konnten aber zahlreiche Proteine der äußeren Membran von *Alc. vinosum* isoliert werden, wobei beide Methoden sehr unterschiedliche Ergebnisse brachten. Bei der Isolierung mit N-Laurylsarkosin war die Präparation deutlich weniger mit Proteinen der inneren Membran verunreinigt als bei der Isolierung mit Nonidet P40. Aus diesem Grund wurde auch nur die erste Isolierung für die anschließende 2D-Gelelektrophorese eingesetzt. Zu dem Zeitpunkt als diese Versuche durchgeführt wurden, stand die Genomsequenz von *Alc. vinosum* DSM 180^T noch nicht zur Verfügung, so dass es nicht möglich gewesen wäre, ein möglicherweise mit der Elementarschwefelaufnahme in Verbindung stehendes Protein z.B. durch Massenspektroskopie relativ einfach zu identifizieren. Deshalb sollte von vornherein so gut wie möglich ausgeschlossen werden, dass versehentlich ein Protein der inneren Membran aufwendig identifiziert wird. Da die Identifizierung von Proteinen nun durch die vorliegende Genomsequenz wesentlich einfacher ist, wäre es lohnenswert, in weiteren Versuchen auch die zweite Isolierung, durch die man

wesentlich mehr Proteine erhält, in die 2D-Gelelektrophorese einzusetzen und diese Methode für Proteine der äußeren Membran weiter zu optimieren. Darüber hinaus wäre es durchaus interessant, alle mit beiden Methoden isolierten Proteine zu identifizieren, um zu überprüfen, welche Proteine der äußeren Membran mit beiden Methoden isoliert werden können.

Bryant *et al.* (1984) zeigten für *Atb. albertensis*, dass die Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion an Elementarschwefel durch Interaktionen zwischen der Glykokalyx des Organismus und der Schwefeloberfläche zustande kommen. Auch für *Atb. ferrooxidans* und *Atb. thiooxidans* wurden extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), die in der Anlagerung der Organismen an Pyrit eine Rolle spielen, als Vermittler eines Zell-Schwefelkontaktes vorgeschlagen (Gehrke *et al.*, 1998; Harneit *et al.*, 2006). Bei EPS handelt es sich um komplexe Mischungen hochmolekularer Polymere (MW > 10000 Da), die sich in erster Linie aus Zuckern, Proteinen und Lipopolysacchariden zusammensetzen, aber auch DNA-Fragmente enthalten (Wingender *et al.*, 1999). Sie beeinflussen stark die physikochemischen Eigenschaften der Zelloberfläche, wobei ihre Zusammensetzung und Menge von vielen verschiedenen Faktoren wie Organismus und Substrat abhängt. Ihre Isolierung gestaltet sich relativ schwierig und ist kaum möglich, ohne dabei auch einen Teil der Zellen zu zerstören, deren Bestandteile die Zusammensetzung der isolierten EPS verfälschen (Nielsen & Jahn, 1999). Zur Isolierung von EPS von *Alc. vinosum*-Zellen wurden in dieser Arbeit verschiedene Methoden probiert, wobei eine Isolierung mit 10 mM Tris-HCl pH 7, 10^{-3} mM Zwittergent und 1 mM EGTA unter gleichzeitigem Scheren der Zellen die besten Ergebnisse lieferte, da in diesen Ansätzen die DNA-Konzentrationen, die auf das Ausmaß der Zerstörung von Zellen hindeutet, relativ niedrig war und gleichzeitig noch gewisse Protein- und Zuckerkonzentrationen von der Zelloberfläche abgelöst werden konnten. Zwischen den extrahierten EPS-Mengen bei photoorganoheterotrophem Wachstum mit Malat und photolithoautotrophem Wachstum mit Elementarschwefel war allerdings kein Unterschied zu erkennen. Sind EPS an der Anlagerung von *Alc. vinosum* an Elementarschwefel beteiligt, wäre wahrscheinlich, dass diese bei Wachstum auf diesem Substrat vermehrt gebildet werden. Eine genauere Analyse der Zusammensetzung der EPS in Bezug auf die einzelnen Zucker war nicht möglich, da es trotz mehrerer Versuche nicht möglich war, die EPS durch Gefriertrocknung und anschließende Suspension so weit zu konzentrieren, dass ihre Bestandteile über dem Detektionslimit der HPLC-Methode lag, die zum Nachweis von Zuckern genutzt werden sollte bzw. bei der Konzentrierung auch andere Komponenten der EPS verstärkt angereichert wurden, die dann wiederum als verunreinigende Peaks eine Analyse unmöglich machten. Auch die Lipidzusammensetzung der EPS konnte nicht untersucht werden, da es an der entsprechenden

Analytik fehlte. Daher kann auf Grund der bisherigen Ergebnisse die Rolle von EPS bei der Anlagerung von *Alc. vinosum* an Elementarschwefel nicht eindeutig geklärt werden. Die fehlenden Unterschiede in den gebildeten Mengen EPS bei photoorganoheterotrophem und photolithoautotrophem Wachstum lassen es jedoch auch möglich erscheinen, dass *Alc. vinosum* sich in seinem Anlagerungsmechanismus von chemotrophen Schwefeloxidierern unterscheidet und EPS nicht an der Adhesion von *Alc. vinosum* an Elementarschwefel beteiligt sind.

Auch die Hydrophobizität der Zelloberfläche (Devasia *et al.*, 1993; Takeuchi & Suzuki, 1997; Gehrke *et al.*, 1998) und das elektrochemische Potential (Blake *et al.*, 1994) spielen eine Rolle in der Anlagerung von Bakterien an Elementarschwefel. So zeigten *Atb. ferrooxidans*-Zellen, die auf Schwefel angezogen worden waren, ausschließlich hydrophobe Oberflächeneigenschaften und lagerten sich nicht an geladene Partikel wie Pyrit an. Die EPS-Zusammensetzung des Organismus wies auch einen deutlich höheren Gehalt an ungeladenen Zuckern im Vergleich zu auf Pyrit angezogenen Zellen auf (Gehrke *et al.*, 1998). Das ζ -Potential von Zellen, die auf Schwefel angezogen worden waren, zeigte zudem, dass sie sich nahe ihrem isoelektrischen Punkt befanden, während die Zellen während des Wachstums auf Pyrit negativ geladen waren (Blake *et al.*, 1994). Ähnliche Beobachtungen konnten für *Alc. vinosum* nicht gemacht werden. Hier waren die Zellen sowohl bei Wachstum auf Malat als auch bei Wachstum mit Sulfid oder Elementarschwefel deutlich negativ geladen.

Der Einfluss der Ladung auf die Aufnahme von Elementarschwefel in *Alc. vinosum* wurde mit Hilfe von LbL untersucht. Allerdings hatte die Oberflächenladung der Zelle keine Auswirkungen auf die Aufnahme von Elementarschwefel. Auch Sulfid konnte problemlos sowohl die negativ wie auch die positiv geladene äußere Membran passieren. Das zeigt, dass sich die Methode tatsächlich eignet, den Einfluss der Ladung auf die Aufnahme von Substraten zu untersuchen. Die angelagerten Polymerschichten bilden keine vollständig dichte Kapsel um die Zelle, die die Aufnahme unabhängig von Ladungseffekten verhindert. Durch die unregelmäßig auf der Zelloberfläche verteilten negativ geladenen Gruppen, die durch das Polymer besetzt werden, ändert sich zwar die Ladung und auch andere Eigenschaften der Zelloberfläche, aber die entstehende Polymerschicht bleibt weiterhin durchlässig für Substrate. Bringt man weitere Polymerschichten auf die Zelle auf, wird die Substrataufnahme mehr und mehr in erster Linie durch die dichter werdende Polymerschicht beeinflusst. Interessant ist dabei, dass nicht die Anzahl der aufgetragenen Schichten allein ausschlaggebend für die Dichte der Kapsel ist, sondern auch durch die verwendeten Polymere beeinflusst wird. Ein Grund dafür könnte sein, dass die anionischen und kationischen

Schichten aus Polyelektrolyten miteinander interagieren und sich gegenseitig penetrieren (Yoo *et al.*, 1998), was zu unterschiedlichen Architekturen der Kapseln führt, wenn unterschiedliche Polymere für die Einkapselung genutzt werden. Wie die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse demonstrieren, interagiert PSS mit PDDA anders als mit PAH. Diese Effekte der gewählten Polymere auf die Dichte der Kapseln bietet eine große Flexibilität bei der Anwendung der Methode.

Die oxidischen Bedingungen, unter denen der Einkapselungsprozess durchgeführt wurde, hatten dabei keinen Einfluss auf die Verwertung von Elementarschwefel und Sulfid, da *Alc. vinosum* über eine Superoxiddismutase verfügt, die für eine gewisse Zeit Schutz vor toxischen Superoxidreaktionen bieten kann (Kanematsu & Asada, 1978). Zudem konnte gezeigt werden, dass die für die Einkapselung genutzten Polymere keine toxischen Effekte für *Alc. vinosum* haben. Solche Effekte waren in einer früheren Arbeit für einige Säugerzelllinien beschrieben worden (Chanana *et al.*, 2005). Auch hatten die Polymerkapseln keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen. Das steht in Einklang mit den Ergebnissen früherer Veröffentlichungen wie der von Hillberg & Tabrizian (2006), die Wachstum und metabolische Aktivität an eingekapselten *E. coli*-Zellen demonstrierten und der von Diaspro *et al.* (2002) für *Saccharomyces cerevisiae*. Fakhrullin *et al.*, (2009) konnte ebenfalls zeigen, dass eingekapselte *S. cerevisiae*-Zellen metabolisch aktiv sind und *Trichoderma asperellum* nach der Einkapselung mittels LbL wächst.

Interessant ist auch, dass sich bei den Experimenten in den initialen ζ -Potentialen der Zellen große Unterschiede zeigten. Es wurde in früheren Arbeiten gezeigt, dass die Oberflächenladung der Zellen stark vom pH-Wert des Kulturmediums abhängt (Plette *et al.*, 1995; Sobolov *et al.*, 2001; Li & McLandsborough, 1999). Diese Beobachtung könnte die unterschiedlichen Oberflächenladungen der unveränderten *Alc. vinosum*-Zellen erklären. Um unnötige Arbeitsschritte, die das Risiko von Kontaminationen erhöht hätten, zu vermeiden, wurde in den Experimenten für jede Einkapselung eine eigene Flasche *Alc. vinosum*-Kultur verwendet. Während des Wachstums mit Malat steigt der pH-Wert in den Kulturen und obwohl die Kulturen alle nach exakt drei Tagen für die Einkapselungen genutzt wurden, wiesen sie sicherlich in Bezug auf ihre Wachstumsphase leichte Unterschiede auf, die zu unterschiedlichen pH-Werten in den Kulturen führten. Da die Ausgangsladung allerdings ohne Bedeutung für die nachfolgende Einkapselung war und nur die finalen ζ -Potentiale Auswirkungen auf die Aufnahme der entsprechenden Substrate hatten, wurde auf das Einstellen eines einheitlichen pH-Wertes verzichtet.

Neben der Untersuchung der Schwefelaufnahme in *Alc. vinosum* war es auch ein Anliegen dieser Arbeit, anhand dieses Beispiels zu zeigen, dass die Layer-by-Layer-Technik als sinnvolle Methode in Fragen der Grundlagenforschung in der Mikrobiologie aber auch in biotechnologischen Anwendungen wie zum Beispiel der Entwicklung von Biofiltern, während Fermentationsprozessen, in denen störende Substrate ausgeschlossen werden sollen oder bei der Entwicklung von neuen Biosensoren eingesetzt werden kann. LbL ermöglicht die Konstruktion von Zelloberflächen mit definierter Architektur an lebenden und metabolisch aktiven Mikroorganismen, wobei die komplette Hülle die kolloidale Stabilität und die äußerste Schicht die Ladung und hydrophilen bzw. hydrophoben Eigenschaften bestimmt (Yoo *et al.*, 1998). Auch die definierte Einlagerung und Aufnahme und anschließende definierte Abgabe verschiedener Moleküle wie Proteine oder Nanopartikel in den Kapseln sind für Eukaryoten und Prokaryoten möglich (Tiourina *et al.*, 2001) und können zum Beispiel für die Erweiterung des Substratspektrums eines Organismus genutzt werden (Mak *et al.*, 2004). Die Auswirkungen einer Änderung der Oberflächenladung der Zelle und des Aufbaus einer physikalischen Barriere auf die Substrataufnahme in *Alc. vinosum* zeigen, dass über Anwendungen von LbL in Verbindung mit der Substrataufnahme von Mikroorganismen nachgedacht werden kann.

2.3 Einfluss von Inhibitoren auf die Schwefelaufnahme in *Alc. vinosum*

Durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren konnte vor allem gezeigt werden, dass die Aufnahme von Elementarschwefel energieabhängig ist. In Anwesenheit des Entkopplers CCCP fand keine Aufnahme von Elementarschwefel mehr statt wogegen die Oxidation von Sulfid und Thiosulfat bis zur Bildung von Schwefelkugeln nicht beeinträchtigt war, was darauf hindeutet, dass für die Schwefelaufnahme Energie aus dem elektrochemischen Potenzial der Zelle benötigt wird. Das steht im Einklang mit den Ergebnissen von Takakuwa *et al.* (1979), die vermutet hatten, dass die Anlagerung von *Ath. thiooxidans* an Elementarschwefel energieabhängig verläuft. Allerdings ist für *Alc. vinosum* bisher nicht klar, ob lediglich die Anlagerung der Zelle an den Elementarschwefel oder die Aufnahme in die Zelle oder beides energieabhängige Prozesse sind. In Eubakterien ist der aktive Transport von Stoffen über die äußere Membran schon seit einiger Zeit bekannt (Nikaido, 1993, Braun, 1995). Große Moleküle wie Vitamin B₁₂ und Fe³⁺-Chelatorkomplexe werden durch ein System aus hochaffinen Rezeptoren der äußeren Membran und den TonB/ExbB/ExbD-Proteinen über die äußere Membran transportiert. TonB koppelt dabei den Transport an einen

Energieeintrag aus dem Protonengradienten der Zelle. Kürzlich wurde diese Art des Transportes auch für Nickel gefunden (Schauer *et al.*, 2007). Es wäre denkbar, dass auch mobilisierter Schwefel durch das TonB/ExbB/ExbD-System in die Zelle transportiert wird. In *Alc. vinosum* wurden entsprechende Gene gefunden, wobei je zwei Homologe von TonB, und ExbB und drei von ExbD im Genom vorliegen (AlvinDRAFT_2949, AlvinDRAFT_2950, AlvinDRAFT_2951 und AlvinDRAFT_0585, AlvinDRAFT_0586, AlvinDRAFT_0587, AlvinDRAFT_0587), deren Rolle in der Schwefelaufnahme zukünftig untersucht werden sollte.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass sowohl die Aufnahme von Elementarschwefel als auch die Oxidation von Sulfid und Thiosulfat ATP-unabhängig verlaufen. Für die Oxidation von Thiosulfat ist bekannt, dass sie von periplasmatischen Proteinen katalysiert wird (Hensen *et al.*, 2006) und für die Oxidation von Sulfid und die Aufnahme von Elementarschwefel ist auf Grund der Lage der Schwefelkugeln ebenfalls anzunehmen, dass es sich um periplasmatische Prozesse handelt. Da ATP im Periplasma nicht vorkommt (Wülfing & Plückthun, 1994), war zu erwarten, dass keine der genannten Reaktionen ATP benötigt.

Takakuwa *et al.* (1979) zeigten außerdem, dass Thiolgruppen in die Adhäsion von *Ath. thiooxidans* an Elementarschwefel beteiligt sind. Auch in *Alc. vinosum* unterband die Blockierung von Thiolgruppen vollständig die Verwertung von Elementarschwefel. Wie bei der Zugabe von CCCP kann allerdings nicht unterschieden werden, ob die Thiolgruppen an der Anlagerung der Zellen an die Schwefelpartikel oder direkt an der Aufnahme oder an beiden Prozessen beteiligt sind. Bei der Oxidation von Thiosulfat und intrazellulärem Schwefel führte die Zugabe von IAA zu einer verlangsamten Oxidation, die Sulfidoxidation wurde von IAA nicht beeinträchtigt. Das entspricht früheren Ergebnissen von Hurlbert (1968), der beschrieben hat, dass IAA inhibitorisch auf die Oxidation von Thiosulfat und intrazellulärem Schwefel wirkt, während es auf die Oxidation von Sulfid keinen Einfluss hatte.

2.4 Potentiell für die Schwefelaufnahme relevante Gene in *Alc. vinosum*

Durch die nun verfügbare Genomsequenz von *Alc. vinosum* DSM180^T war es möglich, dort nach weiteren Genen zu suchen, für die eine Rolle in der Schwefelaufnahme denkbar wäre (alle angeführten Gene stammen aus unveröffentlichten Vorarbeiten von Christiane Dahl). Auffällig waren dabei vor allem mehrere Proteine der äußeren Membran. Die wichtigsten davon sind AlvinDRAFT_1149, AlvinDRAFT_2194 und AlvinDRAFT_2994.

AlvinDRAFT_1149 ist vor allem wegen seiner Lage im Genom interessant. Es schließt sich nahezu direkt an die Polysulfid- und Glutathionamidereduktasegene sowie an *sgpC* an, was darauf hindeuten könnte, dass auch das Produkt von AlvinDRAFT_1149 für den Schwefelstoffwechsel relevant sein könnte. Eine BLAST-Suche (Altschul *et al.*, 1997; Altschul *et al.*, 2005) ergab die größte Ähnlichkeit zu einem Protein der äußeren Membran aus *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707 (YP_342426; $E = 1e^{-101}$). Es gehört zur Bac_surface_Ag-Superfamilie (cl03097), die Oberflächenantigene enthält. In *Alc. vinosum* gibt es ein weiteres Homologes zu diesem Protein, nämlich AlvinDRAFT_0788, dessen Gen allerdings nicht in der Nähe anderer Gene des Schwefelstoffwechsels liegt. Für ein weiteres Protein der äußeren Membran, das an der Aufnahme von Elementarschwefel beteiligt sein könnte, codiert AlvinDRAFT_2194. Es zeigt eine schwache Ähnlichkeit zu Hha1_1947 (YP_001003513; $E = 4e^{-05}$), einem Porin der äußeren Membran aus *Hlr. halophila*, für das aufgrund der Lage seines Gens im Schwefelgencluster eine Rolle in der Verwertung von Elementarschwefel vorgeschlagen wurde (Frigaard & Dahl, 2009). Die größte Ähnlichkeit weist es zu einem Porin aus *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* (CAA65772; $E = 3e^{-28}$) auf und es gehört zur Superfamilie der OM_channels (cl00284). Der dritte mögliche Kandidat für eine Rolle in der Aufnahme von Elementarschwefel wird von AlvinDRAFT_2994 codiert. Es handelt sich dabei um ein Protein, das Ähnlichkeiten ($E = 3e^{-19}$) zu einem Protein der äußeren Membran in *Ath. ferrooxidans* ATCC 23270 (NC_011761; AFE_2542), das bei Wachstum auf Schwefel hochreguliert wird, aufweist (Ramírez *et al.*, 2004). Die größte Ähnlichkeit zeigt es zu SaID aus *Thioalkalivibrio* sp.HL-EbGR7 (YP_002514269; $E = e^{-96}$) und es gehört zur Toluene_X-Superfamilie (cl09488), die Transportproteine der äußeren Membran enthält. Weitere Proteine der äußeren Membran, die für die Schwefelaufnahme in Betracht kämen, weisen Ähnlichkeiten zu OmpH (AlvinDRAFT_0787 und AlvinDRAFT_1861), zu OmpA (AlvinDRAFT_0954, AlvinDRAFT_1467, AlvinDRAFT_2101; AlvinDRAFT_2137; AlvinDRAFT_2178; AlvinDRAFT_2295; AlvinDRAFT_2432; AlvinDRAFT_2637 und AlvinDRAFT_3027) oder TolC (AlvinDRAFT_0706) auf. Da aber keines von ihnen in unmittelbarer Nähe schwefelstoffwechselassoziierter Gene liegt oder eines der Produkte Ähnlichkeiten zu einem Protein aufweist, von dem bekannt ist, dass es an der Elementarschwefelverwertung beteiligt ist, sollen sie hier nicht näher beschrieben werden.

Neben den Genen, die für Proteine der äußeren Membran codieren, stellt auch AlvinDRAFT_1594 ein interessantes Gen dar. Im Genom liegt es in der Nähe der *dsr*-Gene. Zwischen *dsrS* (AlvinDRAFT_1585), dem letzten Gen im *dsr*-Gencluster und AlvinDRAFT_1594 liegen acht andere Gene, die nicht mit dem Schwefelstoffwechsel

assoziiert sind. Das Produkt von AlvinDRAFT_1594 zeigt bei der BLAST-Suche (Altschul *et al.*, 1997; Altschul *et al.*, 2005) die größte Ähnlichkeit zu einem Lipoprotein YfgL aus *Pseudomonas putida* GB-1 (YP_001667145; $E = 2e^{-72}$), das am Aufbau der äußeren Membran beteiligt ist. Es besitzt ein Signalpeptid und gehört zur PQQ-DH-Superfamilie (cl11666), der Dehydrogenasen mit einem Pyrolo-Chinolinchinon-Cofaktor angehören. Zudem zeigt es eine schwache Ähnlichkeit ($E = 0,002$) zu einem PQQ-haltigen Protein der äußeren Membran von *Ath. ferrooxidans* ATCC 23270 (NC_011761; AFE_0029), das nach Buonfiglio *et al.* (1999) bei Wachstum mit Elementarschwefel induziert wird.

Auch zwei periplasmatische Rhodanesen - AlvinDRAFT_0026 und AlvinDRAFT_0880 - könnten eine Rolle in der Verwertung von Elementarschwefel spielen. AlvinDRAFT_0026 zeigt die größte Ähnlichkeit zu einer rhodaneseverwandten Schwefeltransferase aus *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 (ZP_00056235; $E = 2e^{-26}$) und gehört zur RHOD-Superfamilie (cl00125), die Proteine zusammenfasst, die eine rhodanesesähnliche Domäne enthalten. Für AlvinDRAFT_0880 ergab die BLAST-Suche (Altschul *et al.*, 1997; Altschul *et al.*, 2005) als Protein mit der größten Ähnlichkeit ein rhodaneseähnliches Protein aus *Beggiatoa* sp. PS (ZP_02002879; $E = 9e^{-33}$) und es gehört ebenfalls der RHOD-Superfamilie an. Dieses Protein weist zudem Ähnlichkeiten ($E = 1e^{-05}$) zu einer Rhodanese aus *Ath. ferrooxidans* ATCC 19859 (CAC43401) auf, die bei Wachstum auf Elementarschwefel induziert wird (Ramírez *et al.*, 2002).

Ein weiteres Gen, das mit der Verwertung von Elementarschwefel assoziiert sein könnte, ist AlvinDRAFT_0533. Es handelt sich dabei um ein Gen, dessen Produkt eine Ähnlichkeit ($E = 2e^{-05}$) zu einem Polysaccharidexporter in *Ath. ferrooxidans* ATCC 23270 (NC_011761; AFE_1339), der bei Wachstum mit Elementarschwefel induziert wird, zeigt (Ramírez *et al.*, 2004). AlvinDRAFT_0533 besitzt ein Signalpeptid. Die größte Ähnlichkeit weist es zu einem Polysaccharidexporter aus *Nitrosococcus ozeani* ACF27 (YP_343977; $E = 3e^{-65}$) auf und es gehört zur Poly_export-Superfamilie (pfam02563), die periplasmatische Proteine umfasst, die an der Biosynthese und/ oder dem Export von Polysacchariden beteiligt sind. AlvinDRAFT_0533 könnte in *Alc. vinosum* an der Anlagerung der Zelle an den Elementarschwefel mit Hilfe von EPS beteiligt sein.

Eine genauere genetische und biochemische Untersuchung dieser Gene bzw. ihrer Produkte könnte in Zukunft weitere Hinweise darauf liefern, wie Elementarschwefel durch *Alc. vinosum* mobilisiert, aufgenommen und zu Schwefelkugeln umgesetzt wird.

E Zusammenfassung

- ◆ Um die Frage zu klären, ob der komplette Sox-Multienzymkomplex an der Oxidation von Thiosulfat beteiligt ist, wurden die Sulfitoxidationsraten der Mutanten *Alc. vinosum soxBX::Ω-Km* und *soxX::Ω-Km* bestimmt. Sie entsprachen den Oxidationsraten des Wildtyps, so dass eine maßgebliche Beteiligung des Sox-Multienzymkomplexes an der Sulfitoxidation ausgeschlossen werden kann.
- ◆ Die Doppelmutante *Alc. vinosum ΔsoxY-aprAB::Ω-Km* zeigte wie die Einfachmutante *Alc. vinosum ΔsoxY* eine Sulfitoxidationsrate, die im Vergleich zu der des Wildtyps um 60 % reduziert war. Damit kann weiterhin ausgeschlossen werden, dass die APS-Reduktase eine essentielle Rolle in der Sulfitoxidation von *Alc. vinosum* spielt.
- ◆ Die Bildung der Proteine des Sox-Multienzymkomplexes in *Alc. vinosum* wird nur auf transkriptionaler Ebene reguliert. Eine translationale Regulation findet nicht statt.
- ◆ Die Expression der *sox*-Gene steigt bei photolithoautotrophem Wachstum mit Thiosulfat im Vergleich zu photoorganoheterotrophem Wachstum mit Malat stark an. Die Steigerung der Expression ist von der Thiosulfatkonzentration abhängig. Auch bei Wachstum mit Sulfid werden die *sox*-Gene vermutlich auf Grund des Thiosulfates, das während der Sulfidoxidation gebildet wird, stärker exprimiert. Die Expression bei Wachstum mit Sulfit entspricht der unter photoorganoheterotrophen Bedingungen
- ◆ Die Gene *soxB* und *soxX* werden unter allen Wachstumsbedingungen gleich stark exprimiert, während die Expression von *soxY* unter allen Bedingungen deutlich höher ist, was eventuell auf eine zusätzliche physiologische oder regulatorische Funktion von SoxY hindeutet.
- ◆ Die gleichzeitige Anwesenheit von Sulfid und Thiosulfat führt dazu, dass *soxY* nur noch auf einem Level exprimiert wird, das dem von *soxB* und *soxX* entspricht. Das könnte darauf hindeuten, dass Sulfid als Substrat gegenüber Thiosulfat bevorzugt wird.

- ◆ Die mRNA-Kopienzahlen der *sox*-Gene in der Mutante *Alc. vinosum soxB::Ω-Km* wurden bestimmt. In dieser Mutante ist neben *soxB* vermutlich auch das Gen AlvinDRAFT_0674, das für eine putative Multisensorhybridhistidinkinase codiert, inaktiviert. Die Ergebnisse zeigten, dass dieses Protein vermutlich an der Repression der Expression von *soxX* in Abwesenheit von reduzierten Schwefelverbindungen beteiligt ist. Vermutlich bildet sie dabei mit dem in AlvinDRAFT_0675 codierten Antwortregulator ein Zwei-Komponenten-System, wobei der Regulator indirekt über die Bildung des Botenstoffes di-cGMP mit den *sox*-Genen interagiert.

- ◆ Mit Hilfe von XANES-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass *Alc. vinosum*, *Tca. roseopersicina*, *Hlr. halophila* und *Hlr. abdelmalekii* nur die Polymerschwefelfraktion des Elementarschwefels nutzen, während *cyclo*-Oktaschwefel nicht verwertet wird.

- ◆ Für *Alc. vinosum*, *Tca. roseopersicina* und *Hlr. halophila* war ein direkter Zellschwefelkontakt für die Verwertung von Elementarschwefel essentiell. Mit Hilfe der LbL-Nanoeinkapselung von *Alc. vinosum*-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Zellladung keine Rolle für die Anlagerung von Schwefel und Zelle spielt. Weder HPLC- noch XANES-Messungen an Kulturüberständen ergaben Hinweise auf lösliche Intermediate bei der Schwefelaufnahme.

- ◆ Durch Wachstumsversuche mit verschiedenen Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass der Zell-Schwefelkontakt und/ oder die Aufnahme von Elementarschwefel in *Alc. vinosum* von Energie aus dem elektrochemischen Protonengradienten abhängig sind. Auch Thiolgruppen spielen eine Rolle bei der Etablierung des Zell-Schwefelkontaktes und/ oder der Aufnahme von Elementarschwefel. Beide Prozesse verlaufen aber ATP-unabhängig.

- ◆ XANES-Spektroskopie an Kulturüberständen konnte als ergänzende Methode zu den gängigen HPLC-Methoden, die zum Nachweis von Schwefelverbindungen genutzt werden, etabliert werden. Sie erbrachte qualitative Hinweise darauf, dass in den Kulturüberständen bisher nicht berücksichtigte höher oxidierte Verbindungen wie Sulfone und Sulfonate vorliegen.



Literaturverzeichnis

Ai H, Fang M, Jones SA & Lvov YM 2002. Electrostatic Layer-by-Layer nanoassembly on biological microtemplates: Platelets. *Biomacromolecules* **3**: 560-564.

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

Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schäffer AA & Yu Y-K 2005. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* **272**: 5101-5109.

Appia-Ayme C, Little PJ, Matsumoto Y, Leech AP & Berks BC 2001. Cytochrome complex essential for phototrophic oxidation of both thiosulfate and sulfide in *Rhodovulum sulfidophilum*. *J. Bacteriol.* **183**: 6107-6118.

Ausubel FA, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K 1990-1999. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York.

Bacon M & Ingledew WJ 1989. The reductive reactions of *Thiobacillus ferrooxidans* on sulphur and selenium. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**: 189-194.

Bagchi A & Ghosh TC 2006. Structural study of two proteins SigE and ORF1 to predict their roles in the biochemical oxidation of sulfur anions via the global sulfur oxidation operon (sox). *Comp. Biol. Chem.* **30**: 227-232.

Bailey JL & Cole RD 1959. Studies on the reaction of sulfite with proteins. *J. Biol. Chem.* **234**: 1733-1739.

Baldensperger J, Guarraia LJ & Humphreys WJ 1974. Scanning electron microscopy of thiobacilli grown on colloidal sulfur. *Arch. Microbiol.* **99**: 323-329.

Bamford VA, Bruno S, Rasmussen T, Appia-Ayme C, Cheesman MR, Berks BC & Hemmings AM 2002. Structural basis for the oxidation of thiosulfate by a sulfur cycle enzyme. *EMBO J.* **21**: 5599-5610.

Bardischewsky F, Quentmeier A, Rother D, Hellwig P, Kostka S & Friedrich CG 2005. Sulfur dehydrogenase of *Paracoccus pantotrophus*: the heme-2 domain of the molybdoprotein cytochrome *c* complex is dispensable for catalytic activity. *Biochemistry* **44**: 7024-34.

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

Bartsch RG, Newton GL, Sherrill C & Fahey RC 1996. Glutathione amide and its perthiol in anaerobic sulfur bacteria. *J. Bacteriol.* **178**: 4742-4746.

- Bavendamm W 1924.** Die farblosen und roten Schwefelbakterien des Süß- und Salzwassers. In *Pflanzenforschung* (2), Kolkwitz R ed., Verlag G Fischer, Jena, pp. 1-156.
- Bazaraal M & Helinski DR 1968.** Circular DNA forms of colicinogenic factors E1, E2 and E3 from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **36**: 185-194.
- Beggiato FS 1838.** Memoria dells terme Euganee. Padua.
- Beijerinck MW 1895.** Über *Spirillum desulfuricans* als Ursache von Sulfatreduktion. *Centralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig.* **1**: 1-9, 49-59, 104-114.
- Beller HR, Letain TE, Chakicherla A, Kane SR, Legler TC & Coleman MA 2006.** Whole-genome transcriptional analysis of chemolithoautotrophic thiosulfate oxidation by *Thiobacillus denitrificans* under aerobic versus denitrifying conditions. *J. Bacteriol.* **188**: 7005-15.
- Blake RC II, Shute EA & Howard GT 1994.** Solubilization of minerals by bacteria: electrophoretic mobility of *Thiobacillus ferrooxidans* in the presence of iron, pyrite, and sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3349-3357.
- Blight KR, Candy RM & Ralph DE 2009.** The preferential oxidation of orthorhombic sulfur during batch culture. *Hydrometallurgy* **99**: 100–104.
- Bogorov LV 1974.** The properties of *Thiocapsa roseopersicina*, strain BBS, isolated from an estuary of the White Sea. *Mikrobiologiya* **43**: 326-332.
- Borkenstein C & Fischer U 2006.** Bioavailability of elemental sulfur by *Prosthecochloris vibrioformis* proceeds via a reduction to sulfide. In *Abstracts of the International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism ISMSM*, 29.06 - 02.07.2006, Münster, Deutschland, p. 94.
- Braun V 1995.** Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 295-307.
- Brüggemann C, Denger K, Cook AM & Ruff J 2004.** Enzymes and genes of taurine and isethionate dissimilation in *Paracoccus denitrificans*. *Microbiology-UK* **150**: 805-816.
- Brüser T, Lens P & Trüper HG 2000.** The biological sulfur cycle. In *Environmental Technologies to treat sulfur pollution*, Lens P & Pol LH eds., IWA Publishing, London, pp. 47-86.
- Brune DC 1989.** Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **975**: 189-221.
- Brune DC 1995.** Isolation and characterization of sulfur globule proteins from *Chromatium vinosum* and *Thiocapsa roseopersicina*. *Arch. Microbiol.* **163**: 391-399.
- Bryant RD, Costerton JW & Laishley EJ 1984.** The role of *Thiobacillus albertis* glycocalyx in the adhesion of cells to elemental sulfur. *Can. J. Microbiol.* **30**: 81–90.

Bunker HJ 1936. A review of the physiology and biochemistry of the sulfur bacteria, HM Stationery Office, London.

Buonfiglio V, Polidoro M, Soyer F, Valenti P & Shively J 1999. A novel gene encoding a sulfur-regulated outer membrane protein in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Biotechnol.* **72**: 85-93.

Cecil R & Wake RG 1962. Reactions of inter- and intra-chain disulphide bonds in proteins with sulphite. *Biochem. J.* **82**: 401-406.

Chan C, Paul R, Samoray D, Amiot NC, Giese B, Jenal U & Schirmer T 2004. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *PNAS* **101**: 17084-17089.

Chanana M, Gliozzi A, Diaspro A, Chodnevskaja I, Huewel S, Moskalenko V, Ulrichs K, Galla H-J & Krol S 2005. Interaction of polyelectrolytes and their composites with living cells. *Nano Lett.* **12**: 2605-2612.

Chauvistré R, Hormes J, Brück D, Sommer K & Engels H-W 1992. Structural analysis of sulfur in rubber by X-ray near edge absorption spectroscopy. *Kautsch. Gummi Kunstst.* **45**: 808-813.

Cobianchi F & Wilson SH 1987. Enzymes for modifying and labeling DNA and RNA. *Meth. Enzymol.* **152**: 94-111.

Cohn F 1865. Zwei neue Beggiatoen. *Hedwigia* **4**: 81-84.

Combet C, Blanchet C, Geourjon C & Deléage G 2000. NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *TIBS* **25**, **3**:147-150.

Cort JR, Selan U, Schulte A, Grimm F, Kennedy MA & Dahl C 2008. *Allochrochromatium vinosum* DsrC: solution-state NMR structure, redox properties, and interaction with DsrEFH, a protein essential for purple sulfur bacterial sulfur oxidation. *J. Mol. Biol.* **382**: 692-707.

Cramer 1870. In *Chemisch-Physikalische Beschreibung der Thermen von Baden in der Schweiz*, Müller C ed., Baden.

Dahl C 1996. Insertional gene inactivation in a phototrophic sulfur bacterium: APS-reductase-deficient mutants of *Chromatium vinosum*. *Microbiology-UK* **142**: 3363-3372.

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

Dahl C & Prange A 2006. Bacterial sulfur globules: occurrence, structure and metabolism. In *Bacterial Inclusions (Microbiology Monographs, vol 1)*, Shively JM ed., Springer, New York, pp. 21-51.

Dahl C, Prange A & Steudel R 2002. Natural polymeric sulfur compounds. In *Miscellaneous biopolymers and biodegradation of synthetic polymers*, Steinbüchel A ed., Wiley-VCH, Weinheim, pp. 35-62.

Dambe T, Quentmeier A, Rother D, Friedrich CG & Scheidig AJ 2005. Structure of the cytochrome complex SoxXA of *Paracoccus pantotrophus*, a heme enzyme initiating chemotrophic sulfur oxidation. *J. Struct. Biol.* **152**: 229-234.

Decher G 1997. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science* **277**: 1232-1237.

Decher G & Hong JD 1991. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. II: Consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles and polyelectrolytes on charged surfaces. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **95**: 1430-1434.

Denger K, Smits TH, Cook AM 2006. Genome-enabled analysis of the utilization of taurine as sole source of carbon or of nitrogen by *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1.. *Microbiology-UK* **152**: 3197-206.

Devasia P, Natarajan KA, Sathyanarayana DN & Rao GR 1993. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4051-4055.

Diaspro A, Silvano D, Krol S, Cavalleri O & Gliozzi A 2002. Single living cell encapsulation in nano-organized polyelectrolyte shells. *Langmuir* **18**: 5047-5050.

Donath E, Moya S, Neu B, Sukhorukov GB, Georgieva R, Voigt A, Bäuml H, Kiesewetter H & Möhwald H 2002. Hollow polymer shells from biological templates: fabrication and potential applications. *Chem. Eur. J.* **23**: 5481-5485.

Donath E, Sukhorukov GB, Caruso F, Davis SA & Möhwald H 1998. Novel hollow polymer shells by colloid-templated assembly of polyelectrolytes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **37**: 2201-2205.

Durand JM, Olivier-Foucade J, Jumas JC, Womes M, Teodorescu CM, Elafif A, Esteva JM & Karnatak RC 1996. K edge absorption spectra of sulphur in vapour, molecular and polymerized solid phases. *J. Phys. B* **45**: 5773-5784.

Dutta R, Qin L & Inouye M 1999. Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol. Microbiol.* **34**: 633-640.

Ehrenberg CG 1838. Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen. Ein Blick in das tiefere organische Leben der Natur. Leopold Voss-Verlag, Leipzig.

Espejo RT & Romero P 1987. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on elemental sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1907-1912.

Fakhrullin RF, Zamaleeva AI, Morozov MV, Tazetdinova DI, Alimova FK, Hilmutdinov AK, Zhdanov RI, Kahraman M & Culha M 2009. Living Fungi Cells Encapsulated in Polyelectrolyte Shells Doped with Metal Nanoparticles. *Langmuir* **25** : 4628-4634.

Fey A, Eichler S, Flavier S, Christen R, Höfle MG & Guzman CA 2004. Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3618-3623.

- Foussard M, Cabantous S, Pédelacq J-D, Guiller V, Tranier S, Mourey L, Birck C & Samama J-P 2001.** The molecular puzzle of two-component signaling cascades. *Microbes Infect.* **3**: 417-424.
- Franz B 2005.** Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung der *sox*-Gene in *Allochromatium vinosum*. Diplomarbeit, FH Weihenstephan.
- Franz B, Gehrke T, Lichtenberg H, Hormes J, C Dahl & Prange A 2009.** Unexpected extracellular and intracellular sulfur species during growth of *Allochromatium vinosum* with reduced sulfur compounds. *Microbiology-UK* **155**: 2766–2774.
- Franz B, Lichtenberg H, Hormes J, Modrow H, Dahl C & Prange A 2007.** Utilization of solid ‘elemental’ sulfur by the phototrophic purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: a sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy study. *Microbiology-UK* **153**: 1268–1274.
- Friedrich CG, Quentmeier A, Bardischewsky F, Rother D, Kraft R, Kostka S & Prinz H 2000.** Novel genes coding for lithotrophic sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17. *J. Bacteriol.* **182**: 4677-4687.
- Friedrich CG, Quentmeier A, Bardischewsky F, Rother D, Orawski G, Hellwig P & Fischer J 2008.** Redox control of chemotrophic sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus*. In *Microbial Sulfur Metabolism*, Dahl C & Friedrich CG eds., Springer, Berlin, pp. 139–150.
- Friedrich CG, Rother D, Bardischewsky F, Quentmeier A & Fischer J 2001.** Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2873-2882.
- Frigaard NU & Dahl C 2009.** Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **54**: 103–200.
- Galperin MY, Nikolskaya AN & Koonin EV 2001.** Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**: 11-21.
- Gao Y, Mathee K, Narasimhan G & Wang X 1999.** Motif detection in protein sequences. *Proc. of the 6th SPIRE Conference*, 63-72.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD & Bairoch A 2005.** Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*, Walker JM ed., Humana Press, pp. 571-607.
- Gehrke T, Telegdi J, Thierry D & Sand W 1998.** Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2743–2747.
- George GN, Gnida M, Bazylnski DA, Prince RC & Pickering IJ 2008.** X-ray absorption spectroscopy as a probe of microbial sulfur biochemistry: The nature of bacterial sulfur globules revisited. *J. Bacteriol.* **190**: 6376–6383.
- Gilles-Gonzalez MA & Gonzalez G 2004.** Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins. *J. Appl. Physiol.* **96**:774-83.

Giordano G, Haddock BA & Boxer DH 1980. Molybdenum-limited growth achieved either phenotypically or genotypically and its effect on the synthesis of formate dehydrogenase and nitrate reductase by *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiol. Lett.* **8**: 229-235.

Gourse RL, Gaal T, Bartlett MS, Appleman JA & Ross W 1996. rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 645-677.

Grant WM 1947. Colorimetric determination of sulfur dioxide. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **19**: 345-346.

Gresser MJ 1981. ADP-arsenate. Formation by submitochondrial particles under phosphorylating conditions. *J. Biol. Chem.* **256**: 5981-5983.

Griesbeck C, Schütz M, Schödl T, Bathe S, Nausch L, Mederer N, Vielreicher M & Hauska G 2002. Mechanism of sulfide-quinone oxidoreductase investigated using site-directed mutagenesis and sulfur analysis. *Biochemistry* **41**: 11552-11565.

Grimm F, Cort JR & Dahl C 2009. DsrR, a novel IscA-like protein lacking iron-binding function involved in the regulation of sulfur oxidation in *Allochrochromatium vinosum*. Eingereicht.

Grimm F, Franz B & Dahl C 2008. Thiosulfate and sulfur oxidation in purple sulfur bacteria. In *Microbial Sulfur Metabolism*, Dahl C & Friedrich CG eds., Springer, Berlin, pp. 101-116.

Guerrero R, Mas J & Pedros-Alio C 1984. Boyant density changes due to intracellular content of sulfur in *Chromatium warmingii* and *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **137**: 350-356.

Hafner S 2007. Produktion von potentiellen Schwefeltransferasen aus einem Purpurbakterium in *Escherichia coli* und biochemische Charakterisierung der rekombinanten Proteine. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Hageage GJ Jr, Eanes ED & Gherna RL 1970. X-ray diffraction studies of the sulfur globules accumulated by *Chromatium* species. *J. Bacteriol.* **101**: 464-469.

Hanahan D 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

Harneit K, Göksel A, Kock D, Klock J, Gehrke T & Sand W 2006. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* **83**: 245-254.

Hensen D 2006. Biochemical and genetic analysis of the Sox multienzyme complex in the purple sulfur bacterium *Allochrochromatium vinosum*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, <http://hss.ulb.uni-bonn.de/2006/0728/0728.htm>.

Hensen D, Sperling D, Trüper HG, Brune DC & Dahl C 2006. Thiosulphate oxidation in the phototrophic sulphur bacterium *Allochrochromatium vinosum*. *Mol. Microbiol.* **62**: 794-810.

Hernandez ME, Kappler A & Newman DK 2004. Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 921-928.

Hillberg AL & Tabrizian M 2006. Biorecognition through Layer-by-Layer Polyelectrolyte Assembly: In-Situ Hybridization on Living Cells. *Biomacromolecules* **7**: 2742-2750.

Hindennach I & Henning U 1975. The major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane. *Eur. J. Biochem.* **59**: 207-213.

Hormes J, Scott JD & Suller V 2006. Facility update: The Center for Advanced Microstructures and Devices: a status report. *Synchr. Rad. News* **19**: 27-30.

Hübner P, Willison JC, Vignais PM & Bickle TA 1991. Expression of regulatory nif genes in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **173**: 2993-2999.

Hurlbert RE 1968. Effect of thiol-binding reagents on the metabolism of *Chromatium D. J. Bacteriol.* **95**: 1706-1712.

Imhoff JF 1992. The family Ectothiorhodospiraceae. In *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W & Schleifer K-H eds., Springer, New York, pp. 3222-3229.

Imhoff JF 2005a. Genus II. *Allochromatium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR & Staley JR eds., Springer, Berlin, pp. 12-14.

Imhoff JF 2005b. Genus III. *Halorhodospira*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR & Staley JR eds., Springer, Berlin, pp. 12-14.

Imhoff & Caumette, 2005. Genus XIII. *Thiocapsa*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR & Staley JR eds., Springer, Berlin, pp. 12-14.

Imhoff JF & Süling J 1996. The phylogenetic relationship among *Ectothiorhodospiraceae*: a reevaluation of their taxonomy on the basis of 16S rDNA analyses. *Arch. Microbiol.* **165**: 106-113.

Imhoff JF, Süling J & Petri R 1998. Phylogenetic relationships among the *Chromatiaceae*, their taxonomic reclassification and description of the new genera *Allochromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thiococcus*, *Thiohalocapsa* and *Thermochromatium*. *Int. J. Syst. Bact.* **48**: 1129-1143.

Imhoff JF & Trüper HG 1981. *Ectothiorhodospira abdelmalekii* sp.nov., a new halophilic and alkaliphilic phototrophic bacterium. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg., I Abt. C* **2**: 228-234.

Jenal U 2004. Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 185-191.

Kakii K, Sugahara E, Shirakashi T & Kuriyama M 1986. Isolation and characterization of Ca⁺⁺ dependent floc-forming bacterium. *J. Ferment. Technol.* **64**: 57-62.

Kappler U 2008. Bacterial sulfite-oxidizing enzymes: Enzymes for chemolithotrophs only? In *Microbial Sulfur Metabolism*, Dahl C & Friedrich CG eds., Springer, Berlin, pp. 151–169.

Kappler U, Aguey-Zinsou K-F, Hanson GR, Bernhardt PV & McEwan AG 2004. Cytochrome c551 from *Starkeya novella*. Characterization, spectroscopic properties and phylogeny of a diheme protein of the SoxAX family. *J. Biol. Chem.* **279**: 6252-6260.

Kappler U, Friedrich CG, Trüper HG & Dahl C 2001. Evidence for two pathways of thiosulfate oxidation in *Starkeya novella* (formerly *Thiobacillus novellus*). *Arch. Microbiol.* **175**: 102-111.

Kanematsu S, Asada K 1978. Superoxide dismutase from an anaerobic photosynthetic bacterium, *Chromatium vinosum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **185**: 473-482.

Kasianowicz J, Benz R & McLaughlin S 1984. The kinetic mechanism by which CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) transports protons across membranes. *J. Membr. Biol.* **82**: 179-190.

Kelly DP & Wood AP 2000. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov.. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 511–516.

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

Krafft T, Bokranz M, Klimmek O, Schröder I, Fahrenholz F, Kojro E & Kröger A 1992. Cloning and nucleotide sequence of the *psrA* gene of *Wolinella succinogenes* polysulphide reductase. *Eur. J. Biochem.* **206**: 503-510.

Krol S, Cavalleri O, Ramoino P, Gliozzi A & Diaspro A 2003. Encapsulated yeast cells inside *Paramecium primaurelia*: a model system for protection capability of polyelectrolyte shells. *J. Microsc.* **221**: 239-242.

Lashley EJ, Bryant RD, Kobryn BW & Hyne JB 1986. Microcrystalline structure and surface area of elemental sulphur as factors influencing its oxidation by *Thiobacillus albertis*. *Can. J. Microbiol.* **32**: 237–242.

Lane BC & Hurlbert RE 1980. Characterization of the cell wall and cell wall proteins of *Chromatium vinosum*. *J. Bacteriol.* **141**: 1386-1398.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ & Higgins DG 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.

Lee VT, Matewish JM, Kessler JL, Hyodo M, Hayakawa Y & Lory S 2007. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* **65**: 1474-1484.

Lemonnier M, Collet O, Depautex C, Esteva J-M & Raoux D 1978. High vacuum two crystal soft X-ray monochromator. *Nucl. Instr. Meth.* **152**: 109-111.

Leporatti S, Voigt A, Mitlöhner R, Sukhorukov G, Donath E & Helmuth Möhwald 2000. Scanning force microscopy investigation of polyelectrolyte nano- and microcapsule wall texture. *Langmuir* **16**: 4059–4063.

Li J & McLandsborough LA 1999. The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. *Int. J. Food Microbiol.* **53**: 185-193.

Lu W-P, Swoboda EP & Kelly DP 1985. Properties of the thiosulfate-oxidizing multi-enzyme system from *Thiobacillus versutus*. *Biochim. Biophys. Acta* **828**: 116-122.

Lübbe YJ, Youn H-S, Timkovich R & Dahl C 2006. Siro(haem)amide in *Allochromatium vinosum* and relevance of DsrL and DsrN, a homolog of cobyrinic acid *a,c* diamide synthase for sulfur oxidation. *FEMS Microbiol. Lett.* **261**:194–202.

Lvov Y, Decher G & Moehwald H 1993. Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfat) and poly(allylamine). *Langmuir* **9**: 481-486.

Lvov YM, Munge B, Giraldo O, Ichinose I, Suib SL & Rusling JF 2000. Films of manganese oxide nanoparticles with polycations or myoglobin from alternate-layer adsorption. *Langmuir* **16**: 8850-8857.

Lloyd JR 2003. Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 411-425.

Mak WC, Sum KW, Trau D & Renneberg R 2004. Nanoscale surface engineered living cells with extended substrate spectrum. *IEE Proc. Nanobiotechnol.* **151**: 67-71.

Mandal S, Chatterjee S, Dam B, Roy P & Gupta SK 2007. The dimeric repressor SoxR binds cooperatively to the promoter(s) regulating expression of the sulfur oxidation (sox) operon of *Pseudaminobacter salicylatoxidans* KCT001. *Microbiology-UK* **153**: 80-91.

Mendelsohn JD, Barrett CJ, Chan VV, Pal AJ, Mayes AM & Rubner MF 2000. Fabrication of microporous thin films from polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* **16**: 5017-5023.

Müller OF 1786. *Animalcula infusoria fluviatilia et marina. Hauniae.*

Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki RK, Horn GT & Erlich HA 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-335.

Myers JM & Myers CR 2001. Role for outer membrane cytochromes OmcA and OmcB of *Shewanella putrefaciens* MR-1 in reduction of manganese dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 260-269.

Narasimhan G, Bu C, Gao Y, Wang X, Xu N & Mathee K 2002. Mining for motifs in protein sequences. *J. Comp. Biol.* **9**: 707-720.

Nielsen PH & Jahn A 1999. Extraction of EPS. In *Microbial Extracellular Polymeric Substances*, Wingender J, Neu TR & Flemming HC eds., Springer, Berlin, pp. 49-71.

- Nikaido H 1993.** Transport across the bacterial outer membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**: 581-589.
- Ogawa T, Furusawa T, Nomura R, Seo D, Hosoya-Matsuda N, Sakurai H & Inoue K 2008.** SoxAX binding protein, a novel component of the thiosulfate-oxidizing multienzyme system in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *J. Bacteriol.* **190**: 6097-6110
- Ohmura N, Tsugita K, Koizumi J-I & Saiki H 1996.** Sulfurbinding protein of flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **178**: 5776-5780.
- Paschinger H, Paschinger J & Gaffron H 1974.** Photochemical disproportionation of sulfur into sulfide and sulfate by *Chlorobium limicola* former *thiosulfatophilum*. *Arch. Microbiol.* **96**: 341-351.
- Pattaragulwanit K 1994.** Antibiotikasensitivität und konjugativer Transfer von Resistenzplasmiden bei *Chromatium vinosum*. Diplomarbeit, Universität Bonn
- Pattaragulwanit K, Brune DC, Trüper HG & Dahl C 1998.** Molecular genetic evidence for extracytoplasmatic localization of sulfur globules in *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **169**: 434-444.
- Pattaragulwanit K & Dahl C 1995.** Development of a genetic system for a purple sulfur bacterium: conjugative plasmid transfer in *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **164**: 217-222.
- Pellequer J-L, Brudler R & Getzoff ED 1999.** Biological sensors: More than one way to sense oxygen. *Curr. Biol.* **9**: R416-R418.
- Perty M 1852.** Zur Kenntnis kleinster Lebensformen nach Bau, Funktion, Systematik, mit Spezialverzeichnis der in der Schweiz beobachteten. Bern.
- Pfaffl M 2004.** Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA-Quantifizierung. *BIOspektrum* **1/04**: 92-95.
- Pfaffl M & Hageleit M 2001.** Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnol. Letters* **23**: 275-282.
- Pfennig N & Trüper HG 1971.** Type and neotype strains of the species of phototrophic bacteria maintained in pure culture. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**: 19-24.
- Pfennig N & Trüper HG 1974.** The phototrophic bacteria. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Buchanan RE & Gibson NE eds, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 24-64.
- Pfennig N & Trüper HG 1992.** The family Chromatiaceae. In *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W & Schleifer K-H eds., Springer, New York, pp. 3200-3221.

Pittman MS, Robinson HC & Poole RK 2005. A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CydDC) exports reductant to the periplasm. *J. Biol. Chem.* **280**: 32254–32261.

Plette ACC, van Riemsdijk WH, Benedetti M & van der Wal A 1995. pH dependent charging behavior of isolated cell walls of a gram-positive soil bacterium. *J. Colloid Interface Sci.* **173**: 354-363.

Prange A 2008. Speciation analysis of microbiologically produced sulfur by X-ray absorption near edge structure spectroscopy. In *Microbial Sulfur Metabolism*, Dahl C and Friedrich CG eds., Springer, Berlin, pp. 259–272.

Prange A, Arzberger I, Engemann C, Modrow H, Schumann O, Trüper HG, Stedel R, Dahl C & Hormes J 1999. In situ analysis of sulfur in the sulfur globules of phototrophic sulfur bacteria by X-ray absorption near edge spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1428**: 446–454.

Prange A, Chauvistré R, Modrow H, Hormes J, Trüper HG & Dahl C 2002a. Quantitative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different species of sulfur. *Microbiology-UK* **148**: 267–276.

Prange A, Dahl C, Trüper HG, Behnke M, Hahn J, Modrow H & Hormes J 2002b. Investigation of S-H bonds in biologically important compounds by sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy. *Eur. Phys. J. D* **20**: 589-596.

Prange A, Engelhard H, Trüper HG & Dahl C 2004. The role of the sulfur globule proteins of *Allochromatium vinosum*: mutagenesis of the sulfur globule protein genes and expression studies by real-time RT PCR. *Arch. Microbiol.* **182**: 165-174.

Prange A, Hormes J & Modrow H 2008. X-ray absorption spectroscopy as a tool for the detection and identification of sulfur compounds in phototrophic organisms. In *Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms*, Dahl C, Knaff D, Hell R, & Leustek T eds. Series „Advances in Photosynthesis and Respiration“, Springer, Berlin, pp 461-482.

Prange A & Modrow H 2002. X-ray absorption spectroscopy and its application in biological, agricultural and environmental research. *Re/Views Environ. Sci. Bio/Technol.* **1**: 259-276.

Pronk JT, De Bruyn JC & Kuenen JG 1992. Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2227–2230.

Quentmeier A & Friedrich CG 2001. The cysteine residue of the SoxY protein as the active site of protein-bound sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17. *FEBS Lett.* **503**: 168-172.

Ramírez P, Guiliani N, Valenzuela L, Beard S & Jerez CA 2004. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4491–4498.

Ramírez P, Toledo H, Guiliani N & Jerez CA 2002. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1837–1845.

Raymond JC & Sistrof WR 1969. *Ectothiorhodospira halophila*: A new species of the genus *Ectothiorhodospira*. *Arch. Microbiol.* **69**: 121-126.

Rein U, Gueta R, Denger K, Ruff J, Hollemeyer K & Cook AM 2005. Dissimilation of cysteate via 3-sulfolactate sulfo-lyase and a sulfate exporter in *Paracoccus pantotrophus* NKNCYSA. *Microbiology-UK* **151**: 737-747.

Reinartz M, Tschäpe J, Brüser T, Trüper HG & Dahl C 1998. Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **170**: 59-68.

Ressler T 1998. WinXAS: a program for X-ray absorption spectroscopy data analysis under MS-Windows. *J. Synchr. Rad.* **5**: 118-122.

Rethmeier J, Rabenstein A, Langer M & Fischer U 1997. Detection of traces of oxidized and reduced sulfur compounds in small samples by combination of different high-performance liquid chromatography methods. *J. Chromatogr. A* **760**: 295–302.

Römling U & Amikam D 2006. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 218-228.

Römling U, Gomelsky M & Galperin MY 2005. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol. Microbiol.* **57**: 629-639.

Rohwerder T & Sand W 2003. The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp.. *Microbiology-UK* **149**: 1699–1709.

Rother D, Heinrich HJ, Quentmeier A, Bardischewsky F & Friedrich CG 2001. Novel genes of the *sox* gene cluster, mutagenesis of the flavoprotein SoxF and evidence for a general sulfur-oxidizing system in *Paracoccus pantotrophus* GB17. *J. Bacteriol.* **183**: 4499-4508.

Roy AB & Trudinger PA 1970. *The biochemistry of inorganic compounds of sulfur*, Cambridge University Press, London.

Ruimy RV, Breittmayer V, Boivin V & Christen R 1994. Assessment of the state of activity of individual bacterial cells by hybridization with a ribosomal RNA targeted fluorescently labelled oligonucleotidic probe. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**: 207-213.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanchez O, Ferrera I, Dahl C & Mas J 2001. *In vivo* role of APS reductase in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **176**: 301-305.

Sauvé V, Bruno S, Berks BC & Hemmings AM 2007. The SoxYZ complex carries sulfur cycle intermediates on a peptide swinging Arm. *J. Biol. Chem.* **282**: 23194-23204.

Schaeffer WI, Holbert PE & Umbreit WW 1963. Attachment of *Thiobacillus thiooxidans* to sulfur crystals. *J. Bacteriol.* **85**: 137–140.

Schäfer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G & Pühler A 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.

Schauer K, Gouget B, Carrière M, Labigne1 A & de Reuse1 H 2007. Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Mol. Microbiol.* **63**: 1054–1068.

Schedel M, Vanselow M & Trüper HG 1979. Siroheme sulfite reductase from *Chromatium vinosum*. Purification and investigation of some of its molecular and catalytic properties. *Arch. Microbiol.* **121**:29–36.

Schmidt GL, Nicholson GL & Kamen MD 1971. Composition of the sulfur particle of *Chromatium vinosum*. *J. Bacteriol.* **105**: 1137-1141.

Schmidt TG & Skerra A 2007. The Strep-tag system for one-step purification and high affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* **2**: 1528-1535.

Schütz M, Maldener I, Griesbeck C & Hauska G 1999. Sulfide-quinone reductase from *Rhodobacter capsulatus*: requirement for growth, periplasmic localisation, and extension of gene sequence analysis. *J. Bacteriol.* **181**: 6516-6523.

Shen N, Dagsan L, Sledjeski D & Weiner RM 1989. Major outer membrane proteins unique to reproductive cells of *Hyphomonas jannaschiana*. *J. Bacteriol.* **171**: 2226-2228.

Silver M 1970. Oxidation of elemental sulfur and sulfur compounds and CO₂ fixation by *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Microbiol.* **16**: 845–849.

Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M & Römling U 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to mobility. *Mol. Microbiol.* **53**: 1123-1134.

Simon R, Priefer U & Pühler A 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784-791.

Smith AJ 1966. The role of tetrathionate in the oxidation of thiosulphate by *Chromatium* sp. strain D. *J. Gen. Microbiol.* **42**: 371-380.

Smith AJ & Lascelles J 1966. Thiosulphate metabolism and rhodanese in *Chromatium* sp. strain D. *J. Gen. Microbiol.* **42**: 357-370.

Sörbo B 1987. Sulfate: turbidimetric and nephelometric methods. *Methods Enzymol.* **143**:3-6.

Sokolov I, Smith DS, Henderson GS, Gorby YA & Ferris FG 2001. Cell surface electrochemical heterogeneity of the Fe(III)-reducing bacteria *Shewanella putrefaciens*. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 341-347.

Stuedel R 1989. On the nature of the “elemental sulfur” (S^0) reduced by sulfur-oxidizing bacteria – a model for S^0 globules. In *Autotrophic Bacteria*, Schlegel HG & Bowien B eds., Science Tech Publ., Madison, pp. 289-303.

Stuedel R 1996. Mechanism for the formation of elemental sulfur from aqueous sulfide in chemical and microbiological desulfurization processes. *Ind. Eng. Chem. Res.* **35**: 1417-1423.

Stuedel R 2000. The chemical sulfur cycle. In *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution*, Lens P & Pol WH eds., IWA Publishing, London, pp. 1–31.

Stuedel R & Eckert B 2003. Solid sulfur allotropes. In *Elemental Sulfur and Sulfur-Rich Compounds I (Topics in Current Chemistry vol. 230)*, Stuedel R ed., Springer, Berlin, pp. 1–79.

Stuedel R, Holdt G, Visscher PT & van Gernerden H 1990. Search for polythionates in cultures of *Chromatium vinosum* after sulfide incubation. *Arch. Microbiol.* **155**: 432-437.

Stuedel R & Holz B 1988. Detection of reactive sulfur molecules (S_6 , S_7 , S_9 , S_m) in commercial sulfur, in sulfur minerals, and in sulfur metals slowly cooled to 20°C. *Z. Naturforsch. B* **43**: 581-589.

Stock JB, Ninfa AJ & Stock AM 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**: 450-90.

Stock AM, Robinson VL & Goudreau PN 2000. Two-Component Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 183-215.

Sukhorukov GB, Donath E, Davis S, Lichtenfeld H, Caruso F, Popov VI & Möhwald H 1998. Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Polym. Adv. Technol.* **9**: 759-767.

Suzuki H, Koyanagi T, Izuka S, Onishi A & Kumagai H 2005. The *yliA*, *-B*, *-C*, and *-D* genes of *Escherichia coli* K-12 encode a novel glutathione importer with an ATP-binding cassette. *J. Bacteriol.* **187**: 5861–5867.

Swanson RV, Alex LA & Simon MI 1994. Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 485-90.

Takakuwa S, Fujimori T & Iwasaki H 1979. Some properties of cell–sulfur adhesion in *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **25**: 21–29.

Takeuchi TL & Suzuki I 1997. Cell hydrophobicity and sulfur adhesion of *Thiobacillus thiooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2058-2061.

Taylor BL & Zhulin IB 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 479-506.

Then J & Trüper HG 1983. Sulfide oxidation in *Ectothiorhodospira abdelmalekii*. Evidence for the catalytic role of cytochrome *c-551*. *Arch. Microbiol.* **130**: 143-146.

- Tiourina OP, Antipov AA, Sukhorukov GB, Larionova NI, Lvov YM, & Möhwald H 2001.** Entrapment of α -Chymotrypsin into hollow polyelectrolyte microcapsules. *Macromol. Biosci.* **1**: 209-214.
- Thiele HH 1968.** Die Verwertung einfacher organischer Substanzen durch *Thiorhodaceae*. *Arch. Mikrobiol.* **60**: 124–138.
- Trevisan V 1842.** Prospetto della Flora Euganea. Coi Tipi Del Seminario, Padova, pp. 1-68.
- Trüper HG & Pfennig N 1966.** Sulphur metabolism in Thiorhodaceae. III. Storage and turnover of thiosulphate sulphur in *Thiocapsa floridana* and *Chromatium* species. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **32**: 261-276.
- Tsukruk VV 1997.** Assembly of supramolecular polymers in ultrathin films. *Prog. Polym. Sci.* **22**: 247-311.
- Uden G 2007.** Regulation des Stoffwechsels und des Zellaufbaus von Bakterien. In *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Fuchs, ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 491-523.
- Urich T, Gomes CM, Kletzin A & Frazão C 2006.** X-ray structure of a self-compartmentalizing sulfur cycle metalloenzyme. *Science* **311**: 996–1000.
- Vairavamurthy A, Zhou W, Eglinton T & Manowitz B 1994.** Sulfonates: a novel class of organic sulfur compounds in marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **58**: 4681–4687.
- Van Niel CB 1931.** On the morphology and physiology of the purple and green sulfur bacteria. *Arch. Mikrobiol.* **3**: 1-112.
- Van Niel CB 1936.** On the metabolism of the *Thiorodaceae*. *Arch. Mikrobiol.* **7**: 323-358.
- Veerabadran NG, Goli PL, Stewart-Clark SS, Lvov YM & Mills DK 2007.** Nanoencapsulation of stem cells within polyelectrolyte multilayer shells. *Macromol. Biosci.* **7**: 877-882.
- Visscher PT, Nijburg JW & van Gernerden H 1990.** Polysulfide utilization by *Thiocapsa roseopersicina*. *Arch. Mikrobiol.* **155**: 75-81.
- Vogler KG & Umbreit WW 1941.** The necessity for direct contact in sulphur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*. *Soil Sci.* **51**: 331-337.
- Watanabe M, Sasaki K, Nakashimada Y, Kakizono T, Noparatnaraporn N & Nishio N 1998.** Growth and ocellation of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp.. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 682-691.
- Warming E 1875.** Om nogle ved Danmarks kyster levede bakterier. *Vidensk Medd. Dan. Naturhist. Foren. Khobenhavn* **20-28**: 3-116.
- Weaver PF, Wall JD & Gest H 1975.** Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata* *Arch. Mikrobiol.* **105**: 207-216.

Weinitschke S, Denger K, Cook AM & Smits TH 2007. The DUF81 protein TauE in *Cupriavidus necator* H16, a sulfite exporter in the metabolism of C2 sulfonates. *Microbiology-UK* **153**: 3055-60.

Welte C, Hafner S, Krätzer D, Quentmeier A, Friedrich CG & Dahl C 2009. Interaction between Sox proteins of two physiologically distinct bacteria and a new protein involved in thiosulfate oxidation. *FEBS Lett.* **583**: 1281-1286.

Wingender J, Neu TR & Flemming H-C 1999. What are bacterial extracellular polymeric substances? In *Microbial Extracellular Polymeric Substances*, Wingender J, Neu TR & Flemming HC eds., Springer, Berlin, pp. 1-19.

Wülfing C & Plückthun A 1994. Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **12**: 685-692.

Yoo D, Shiratori SS & Rubner MF 1998. Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes. *Macromolecules* **31**: 4309-4318.



Anhang

1 Alignment AlvinDRAFT_0674

gi|241775859|ref|ZP_04773141.1: *Allochromatium vinosum* DSM 180
 gi|121998929|ref|YP_001003716.1: *Halorhodospira halophila* SL1
 gi|225198924|ref|ZP_03738052.1: *Desulfonatronospira thiodismutans* ASO3-1
 gi|119776084|ref|YP_928824.1: *Shewanella amazonensis* SB2B
 gi|117926684|ref|YP_867301.1: *Magnetococcus* sp. MC-1
 gi|171060213|ref|YP_001792562.1: *Leptothrix cholodnii* SP-6
 gi|83593696|ref|YP_427448.1: *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170

Die H- (rot), N- (grün), G (blau)- und F-Boxen (lila) des Histidinkinasesegments und die konservierten Bereiche um die Aspertatreste der REC-Domänen (gelb) sind markiert.

```

gi|241775859|ref|ZP_04773141.1|-----
gi|121998929|ref|YP_001003716.1|-----
gi|225198924|ref|ZP_03738052.1|-----
gi|119776084|ref|YP_867301.1|MMRMLLLVGLVGLLAWLPSSWAGDEPPIHADIRHRPPEMIVHGGFMGGPLK 50
gi|171060213|ref|YP_001792562.1|-----
gi|119776084|ref|YP_928824.1|-----
gi|83593696|ref|YP_427448.1|-----

gi|241775859|ref|ZP_04773141.1|-----
gi|121998929|ref|YP_001003716.1|-----
gi|225198924|ref|ZP_03738052.1|-----
gi|119776084|ref|YP_867301.1|EVLEQAAAALQRKVVWRSVPFSESYKDLQSGAVDVVPRITIRTAEREPFVH 100
gi|171060213|ref|YP_001792562.1|-----
gi|119776084|ref|YP_928824.1|-----
gi|83593696|ref|YP_427448.1|-----

gi|241775859|ref|ZP_04773141.1|-----
gi|121998929|ref|YP_001003716.1|-----
gi|225198924|ref|ZP_03738052.1|-----
gi|119776084|ref|YP_867301.1|FLGPIGQQNKAILFLLRKGQERQIRSLADLHGLTVGVKPKTAYFPADFQD 150
gi|171060213|ref|YP_001792562.1|-----
gi|119776084|ref|YP_928824.1|-----
gi|83593696|ref|YP_427448.1|-----

gi|241775859|ref|ZP_04773141.1|-----
gi|121998929|ref|YP_001003716.1|-----
gi|225198924|ref|ZP_03738052.1|-----
gi|119776084|ref|YP_867301.1|ESITKLPTEGGDYGLVTRLIEGTADVAVVLDQAAMESALAGLGFKDYAYA 200
gi|171060213|ref|YP_001792562.1|-----
gi|119776084|ref|YP_928824.1|-----
gi|83593696|ref|YP_427448.1|-----

gi|241775859|ref|ZP_04773141.1|-----
gi|121998929|ref|YP_001003716.1|-----
gi|225198924|ref|ZP_03738052.1|-----
gi|119776084|ref|YP_867301.1|PFRHEQIIENYFGFSKNSPLAAVAPALNHLQEMAASGQIEAIYARHQAN 250
gi|171060213|ref|YP_001792562.1|-----
gi|119776084|ref|YP_928824.1|-----
gi|83593696|ref|YP_427448.1|-----

gi|241775859|ref|ZP_04773141.1|-----
gi|121998929|ref|YP_001003716.1|-----

```


gi	241775859	ref	ZP_04773141.1	-----	
gi	121998929	ref	YP_001003716.	-----	
gi	225198924	ref	ZP_03738052.1	-----	
gi	117926684	ref	YP_867301.1	VSPYSDDLAFGIRQDWQPLVAIMDKAIAAIPASERERIQRSWGGGSLTQG	750
gi	171060213	ref	YP_001792562.	-----	
gi	119776084	ref	YP_928824.1	-----	
gi	83593696	ref	YP_427448.1	-----	
gi	241775859	ref	ZP_04773141.1	-----	
gi	121998929	ref	YP_001003716.	-----	
gi	225198924	ref	ZP_03738052.1	-----	
gi	117926684	ref	YP_867301.1	MEPSQLESIPYGRGLGWMVLALVGVLLVVERILDRSGADVQSFYRSRSAKT	800
gi	171060213	ref	YP_001792562.	-----	
gi	119776084	ref	YP_928824.1	-----MQENTEKLSFRRSRILFQ	18
gi	83593696	ref	YP_427448.1	-----	
gi	241775859	ref	ZP_04773141.1	-----	
gi	121998929	ref	YP_001003716.	-----	
gi	225198924	ref	ZP_03738052.1	-----	
gi	117926684	ref	YP_867301.1	LGVSLVAVLMVFVVVMAWLFIEHQERQTRQRTGESLSTLLQTTHEALSIW	850
gi	171060213	ref	YP_001792562.	-----	
gi	119776084	ref	YP_928824.1	IAVPLIIIMTGVSGVTGWLNYKAEKKAFFADLAEKADFAAKRLEFELTLA	68
gi	83593696	ref	YP_427448.1	-----	
gi	241775859	ref	ZP_04773141.1	-----	
gi	121998929	ref	YP_001003716.	-----MYAPPLRALATEHVVTLPASASVGEAVRTMQDHNIRDV	38
gi	225198924	ref	ZP_03738052.1	-----	
gi	117926684	ref	YP_867301.1	VRGNRNFLOAM-ARDLEIRHYTQALVASDLADLSRNPAAQQEMAAHFQRFVI	899
gi	171060213	ref	YP_001792562.	-----MPAGAIIVLS	9
gi	119776084	ref	YP_928824.1	QQDTQTLAFTLGHLDAKAQLQAPFLYQLLTDRLARNSFYGSAVAVFPG	118
gi	83593696	ref	YP_427448.1	-----MTGTTGLGRR	10
gi	241775859	ref	ZP_04773141.1	-----	
gi	121998929	ref	YP_001003716.	VVTRDRGFRLFLSTMLLRDLH----LGADLETPLGRLLPRATTLSPDAS	84
gi	225198924	ref	ZP_03738052.1	-----MNTGSS	6
gi	117926684	ref	YP_867301.1	LAREAQSFALLDATGTIRFSTNSHDLGKQHALASLRADALAKVFAGEGVF	949
gi	171060213	ref	YP_001792562.	LCAAAIAGWLLVAAGDARPEAPQHAWAPWLASAAG-----LLGNAVL	51
gi	119776084	ref	YP_928824.1	FTPGQERFAPYVFRQDLTIATLDIGKAYDYTNGEWDWTEALKRPGYV	168
gi	83593696	ref	YP_427448.1	IWWWIVGAVLAGIGLSGFVWVVTQRNAELAETAASLELTRLSDAIAER	60
gi	241775859	ref	ZP_04773141.1	-----	
gi	121998929	ref	YP_001003716.	VVDGLRAIRNRGEHICLVDDRGEISGI-LSYTDLASGLDPNMLAQTQSIG	133
gi	225198924	ref	ZP_03738052.1	SQNKWLIHSQRLAAVLVLAGILLNVGL-LSFMQIKP-----	41
gi	117926684	ref	YP_867301.1	IAPLLEPVEGEARPSLFMMPEVKNATG-QTLAALAQRLDPTQEWTRIANV	998
gi	171060213	ref	YP_001792562.	AVWLWRRVRRRCRQVESQMQQLAEHGL-LALVARRTSNAVIITDRALRIT	100
gi	119776084	ref	YP_928824.1	TAPYYDDGAGNIQMITFSQPFQDEEPLGVVTTDLALSSLPIRLGIDPKKL	218
gi	83593696	ref	YP_427448.1	ITLYQYGLRGARGVIVTFGERGITREVFVRGYSKTRDIGAEFFPGARGFGFI	110
gi	241775859	ref	ZP_04773141.1	-----	
gi	121998929	ref	YP_001003716.	ELFRWTPAPLLNPDATLRGAMAAMREQDQEAADVDDDERPVGILTOK---	180
gi	225198924	ref	ZP_03738052.1	EIVVHTSMVIEGLFVFLVGGILIFIFCCRHTWMQGLNRFVLVFLG---	88
gi	117926684	ref	YP_867301.1	GRLNKGTETYLFNQAGILASESRFLYQLKQLVGEQENSILNLRLDGPG	1048
gi	171060213	ref	YP_001792562.	WVNDAFQVYQYSPQALGATPGRLLGHPDSSPAIDTLRSAAAGVG--	148
gi	119776084	ref	YP_928824.1	LVLDAAGTLIYHPDNNLNRNATISDWLVKDKVASEEAAKKVLEGEAQEVAL	268
gi	83593696	ref	YP_427448.1	RRVPADREERFLAEARADGWPDFAIAQFTPHEGERFVIQYIEPAQRN---	157
gi	241775859	ref	ZP_04773141.1	-----	
gi	121998929	ref	YP_001003716.	-----DIIKLLAAGTDLGCTLEACMSSPVETLHEQASIA	214
gi	225198924	ref	ZP_03738052.1	-----VGMLFLYAATDFASNFLTASGDFVHVSVEIARL	122
gi	117926684	ref	YP_867301.1	GDLFKGYTPHKTRDQYPLTRMAQAIAIKGQSQDIEGYRDRYRVPVLGVWL	1098
gi	171060213	ref	YP_001792562.	-----CRVEILNRAADGHVVDVTEVQPVHDDAG--	177
gi	119776084	ref	YP_928824.1	KDLNG-----VQYLASIAKVSPLAWRVLVIPTQTELVEFLKGFSS	309
gi	83593696	ref	YP_427448.1	-----LKAVGLDIASEKNRREAALAAIDTGQVRLTGP--	189
gi	241775859	ref	ZP_04773141.1	-----	
gi	121998929	ref	YP_001003716.	EALSFCRQRRIKRVVVVDDAGRLTGVIQKELVNLYFNQWFALLQEQQDE	264
gi	225198924	ref	ZP_03738052.1	AAIS-----LLVISAGLWIRDLMRTRQM	145
gi	117926684	ref	YP_867301.1	WDSELGLGMVSEVDVQDALTSYANRNALLWVLAVTLLLSLALTVFSALL	1148
gi	171060213	ref	YP_001792562.	-----QVIGFVEIATDISASKL	194
gi	119776084	ref	YP_928824.1	LTLSSLVLALILLVTSYYSAKRLTEPLEALETGIVDFSKGLIKRLQKPEG	359

```

gi | 83593696 | ref | YP_427448.1 | -----ITLVQASGDKSQSFLI 205

gi | 241775859 | ref | ZP_04773141.1 | -----
gi | 121998929 | ref | YP_001003716.1 | LAQLNRELQESNRALESITEEVPGGLLVVGADGHI SRTSRR-ALSILNTS 313
gi | 225198924 | ref | ZP_03738052.1 | LLRNEKRLDESEQRFRDVAEAAAGEYIWEIDPGGTY SFLTPT-VEDVLGRR 194
gi | 117926684 | ref | YP_867301.1 | GERANRQLLKSCKDELEDMVQSRMTALNRASEGLNLALSSMSGNGLIMLDQA 1198
gi | 171060213 | ref | YP_001792562.1 | AVQEIADQRRRLAAIIDGTQAGTWEHDLAKSEN RVNAAAYQMLGYTLP EY 244
gi | 119776084 | ref | YP_928824.1 | VVREIATLSHKFNEMAEVLEEREQALLDSRGNRFATLIDGMSDKSFYCSM 409
gi | 83593696 | ref | YP_427448.1 | LLPIYRTLSTPETLAERRAQAFGWSYAPLNMPEVLSGLVPNQDRLALTLR 255

gi | 241775859 | ref | ZP_04773141.1 | -----MFFPKLRS-----IAAT 12
gi | 121998929 | ref | YP_001003716.1 | SEALIGRSVFTLLGCTPGSGCPGLASAPPLRCPYS GPPISADSCELIGA 363
gi | 225198924 | ref | ZP_03738052.1 | VDEVLRGRSPDFMPHEARRVEKMLAGWAEKGES-----WQGL 232
gi | 117926684 | ref | YP_867301.1 | LTLILVNGHYLSLLQLPETLVGVGKPIEPVVRYLVVVG-----DYGA VD 1242
gi | 171060213 | ref | YP_001792562.1 | TALLRAHSFPLVHPDDLARVEQARESHLTGRSS-----EYEA 282
gi | 119776084 | ref | YP_928824.1 | TPDGNIDQVSAGVEKVLGISPEVLKRRYQRLFSSNAIN----EQNWQFME 455
gi | 83593696 | ref | YP_427448.1 | DVTNPAAEAETVFTSNTDCAAAECVTKTLTRSI FG-----RVWEI 294

gi | 241775859 | ref | ZP_04773141.1 | EAARQDVEFRTLFEVYPDATILIDP-----ADG-STLEFNQVSCA 51
gi | 121998929 | ref | YP_001003716.1 | LRSGEAYETRDLFQAPGEPEVLVDVR----IKRAATDGT TILLLFQEVSK E 409
gi | 225198924 | ref | ZP_03738052.1 | EHQSVRPDGRIIWQRVSGMPVKDSEG----ELKGRGTGLDITAEKEARQ 278
gi | 117926684 | ref | YP_867301.1 | EESMVRQQLQSMRQQQSGNIELNTPDRRSIDVHQAP TETGGMVFTLTDVT 1292
gi | 171060213 | ref | YP_001792562.1 | EFRMRHKAGHWVWVQSRGRVTGHDAHG---RPLVIAGIHLDSARKHAEL 329
gi | 119776084 | ref | YP_928824.1 | MALRGEAVPPHQVEMAGADGSLRRLDLFMQPLLDDEGQLISVEMLDLAPT 505
gi | 83593696 | ref | YP_427448.1 | SVTVSPAYGHAVQRIAPWVVVSLGIG----ASILAGFAAVIGL NQARRR 340
:

gi | 241775859 | ref | ZP_04773141.1 | Q-----LGYTSEEFAR- 62
gi | 121998929 | ref | YP_001003716.1 | EQNRTEALAFNLGGPVVALSWRPEPGWVPHYASANVE QVLGYTAEELKAP 459
gi | 225198924 | ref | ZP_03738052.1 | ATQELTERLRLATEAAELGIWDLRISDGYLEWDEGMFR IYGVSRDDFTNS 328
gi | 117926684 | ref | YP_867301.1 | ERKRSEERLNLALEGGSLGYWDVNLITDEM VVNQRWAEMLGYLDEISPV 1342
gi | 171060213 | ref | YP_001792562.1 | ELTRGQRLANILAGTVDGTWEWNVETGETIFNERWAGIAGI SVELTDELAPT 379
gi | 119776084 | ref | YP_928824.1 | EQFSAAAWSNAVLEAAPEAMLIVDESGQLVFSNSRCQELFGYSGEEMNL 555
gi | 83593696 | ref | YP_427448.1 | EIAQAQARLSTIVENSGDAIIGEALDGTIVGWNRAEALFGYK APEVIG- 389
*
:

gi | 241775859 | ref | ZP_04773141.1 | --LRISDYEVQESAEDVAAHIRRVLTQGRDEFETQH--RHKDG--RVIDV 106
gi | 121998929 | ref | YP_001003716.1 | G-FRFADLLHPEDTQRVDREIRAQLADGAAHFQ LYRVRHRSGGYRWCYD 508
gi | 225198924 | ref | ZP_03738052.1 | V-KDWTDALLPEYREQAEQDFKAGIAG-QGAYRSEFK IRRKDGGEIRHRA 376
gi | 117926684 | ref | YP_867301.1 | LRQTWLETIHPEDLRLARGNDYRAGVLDREVEVEYR ARAKDGTARWVLS 1392
gi | 171060213 | ref | YP_001792562.1 | HIGTWSALTHPDDLRSVALLLEHHFNGALPAYECEV MRHRDGHGWVLD 429
gi | 119776084 | ref | YP_928824.1 | NIDALIPENERHG HQGRQLFIEGGRDKVMANGKPLHALKCGGEQFPVQI 605
gi | 83593696 | ref | YP_427448.1 | --KALAPLLIPADRMENQSI VLSALSGEAVMAFD TQRIHADGHLFDVSM 437
*
:

gi | 241775859 | ref | ZP_04773141.1 | S-VAVSCLDLGERPVLLAVVRDISRRKQDERQAHQAEERLQLATEAAKLG 155
gi | 121998929 | ref | YP_001003716.1 | Y-TSPYNEDEGQLRLLRGYILDRTEEQTLEQLTRSRERLALATESAGLG 557
gi | 225198924 | ref | ZP_03738052.1 | M-AQSIHDETGNPVRVVGINEDITQKMAEQELRQERDYSSRIIQMSPA I 425
gi | 117926684 | ref | YP_867301.1 | RGAIMEHQEDGQPRRMVGTVDITERKLMEAAALSESEERSRLLTSTVDG 1442
gi | 171060213 | ref | YP_001792562.1 | RGKLSGRSESGRPLWMAGTHMDISERKHAEALRASQDLLDR TGRIGGVG 479
gi | 119776084 | ref | YP_928824.1 | GLSLLPADSRG--RQVAASIRDLTEQLAVERQIRESESRFRGLVSNIPGA 654
gi | 83593696 | ref | YP_427448.1 | T-ACPVHDLGHVVVGVANLIRDIRKRKAAEQSLLEFNAQLEKQVASRTAE 486
*
:

gi | 241775859 | ref | ZP_04773141.1 | IWDYD-----IQQ--DRLIWDERMFQLYGLEPREFGYRFVDW 190
gi | 121998929 | ref | YP_001003716.1 | IWDYD-----LTS--DQLDWDEGMFRLYGVSS EAFGGTFQDW 592
gi | 225198924 | ref | ZP_03738052.1 | ICGIS-----SDG--TCNVNVPAGEKVTGYSAQELV G--KDW 458
gi | 117926684 | ref | YP_867301.1 | IFGMD-----AQG--CTTFVNPAAMMLGYREDEL TGMMLMHD 1477
gi | 171060213 | ref | YP_001792562.1 | GWSYD-----LGT--QEILWTDQTCRIHGVPEP G--HRPTLTEV 513
gi | 119776084 | ref | YP_928824.1 | VYRTR-----INGTWTMEYVSDNITELTGYP AWHFIESKKRS 691
gi | 83593696 | ref | YP_427448.1 | LEKARRALQTVLDSVPSMIGYWRDLRHCHIANRAYCS WFNVDPSGLIGKS 536
:

gi | 241775859 | ref | ZP_04773141.1 | STLVLPP---ESLQRVKADFQALVESGRPFVDVKFQ IRRPSDGEIRTLRGLA 237
gi | 121998929 | ref | YP_001003716.1 | TRTLMP---ESRERAQAAFEQAVAYSSTFETTISIR RPIDGAERILQQA 639
gi | 225198924 | ref | ZP_03738052.1 | WSTLYP---GSSYEQVRQLFQDMQNGPVPQNHEM TLTRK-DGHERIVEWNS 504
gi | 117926684 | ref | YP_867301.1 | TVHSHDPDGSYPYAEHQCPMRAAFAEGAVRVI TDEVLWHKDGHAFFPEYTA 1527
gi | 171060213 | ref | YP_001792562.1 | MSYFDP---ESRPLLEQAVQRSIATG--EGYDMELP FTTAGGQHIWVRVA 558
gi | 119776084 | ref | YP_928824.1 | FGSLILD--EDAERCDAIISGALAEQHA FEVEYRIRHR-DGSLRWVHEKG 738
gi | 83593696 | ref | YP_427448.1 | MRSLLG---EALFTANRPFIEAVLRGQPQTFERMIP RP-NGQGVRHSLAH 582
*
:

gi | 241775859 | ref | ZP_04773141.1 | RVTHDDQGRAIRVVGVNEDITQFQAVQREILDRE-----QRLQQLAEQ 280
gi | 121998929 | ref | YP_001003716.1 | QIIRDETQAVRVVGVNRDITEQETNRRRLIAEE-----AKFRGLFEL 682
gi | 225198924 | ref | ZP_03738052.1 | LNRLDQEENLLEVVGFHGDITDRRIAEEELFKRQDELEKTTRELEGGF DV 554

```



```

gi|241775859|ref|ZP_04773141.1|VLINLLSNAVKFT-EQQQVVLISIRQLDAG----- 674
gi|121998929|ref|YP_001003716.1|VLINLLSNATKFT-EGGEVEMGIQLVEPPK----- 1076
gi|225198924|ref|ZP_03738052.1|VFTINLLGNNAVKFT-EKGHVELAVHKSEVRSQSESEVRDQGTVEVRSQDLQGG 971
gi|117926684|ref|YP_867301.1|VLINLGNNAVKFT-AHGDVVVKVQQLERTT----- 1988
gi|171060213|ref|YP_001792562.1|VLINLGNNAIKFT-AEGEVVSVAVRERSALG----- 1001
gi|119776084|ref|YP_928824.1|VLINLMNNAIKFT-ERGEVMLSISELARDE----- 1184
gi|83593696|ref|YP_427448.1|VLLNLAGNALKFT-DQQQVIVSVGLVARED----- 1043
*: ** .** *** *.* : :

gi|241775859|ref|ZP_04773141.1|-----TASARLRFVDRDTGIGIAPEQQTRLFKPFSSQADS 708
gi|121998929|ref|YP_001003716.1|-----ADSVTLRFFVDRDTGIGMSEEQLGRLFRAFTQADT 1110
gi|225198924|ref|ZP_03738052.1|TGDRGQGLEAADRDSESKIVRLLFEIKDTGIGMDDEQVQRLFQPFSSQADT 1021
gi|117926684|ref|YP_867301.1|-----ERIKLYFSVKDSGIGMTPEQKGLLFKSFSQADA 2021
gi|171060213|ref|YP_001792562.1|-----VTLQIAVDRDTGIGIAAENQARIFSAFTQAEA 1032
gi|119776084|ref|YP_928824.1|-----DQVQLKFAVRDSGIGLTAEQQAFLFKSFSQADT 1217
gi|83593696|ref|YP_427448.1|-----DRLTMRMAVSDTGIGIAADQLASTFGAFEOAET 1076
: : *::*: : : *.* **::

gi|241775859|ref|ZP_04773141.1|STTRRYGGTGLGLVVISQKLVEKMGGLVLESTPGAGSRFYFDLTLPVSSD 758
gi|121998929|ref|YP_001003716.1|STTRRYGGSGLGLVISRRLVERMGGALEATSKPGQGSTFAFELTLPLGTP 1160
gi|225198924|ref|ZP_03738052.1|STTRKYGGTGLGLVISHKLVQRMGGTLQVDSSTPGQGSRFYFELDLPMA- 1070
gi|117926684|ref|YP_867301.1|STTRKFGGTGLGLAISKRLVEMMEGEIDVDSVPEQGSDFHFSAWFGLVE 2071
gi|171060213|ref|YP_001792562.1|STTRRFGGTGLGLVAISQRLVALMGGELQVASEPGRGSRFHFICLTPVAPE 1082
gi|119776084|ref|YP_928824.1|STTRKYGGTGLGLAICKQLVELMGGELGVDSQFNGNSTFYFTVSVKVAQN 1267
gi|83593696|ref|YP_427448.1|STTRRYGGSGLGLTITRHLVERMGGVLRVESQPRGSRFWDITLTPVSGE 1126
****:****:* :*** * * : * ** * * . : .

gi|241775859|ref|ZP_04773141.1|QTRPSSPGD-VPRGGRVLIVDDQADARTVLRGLLDSHGFEVEEADSGRAA 807
gi|121998929|ref|YP_001003716.1|QAPATLHCP-KTEGRHVLIIVDDHEPTRETLREMLLHCHFEEVEATNGEEA 1209
gi|225198924|ref|ZP_03738052.1|ESETTQECI-GFDSHRVLIIVDDHEAARQVLRNILESCHMFQVKEAHDGRSA 1119
gi|117926684|ref|YP_867301.1|RGEETLRVERDLANLHLLVVDNSTARILAEQAQSGFRVDTAESGAAA 2121
gi|171060213|ref|YP_001792562.1|PADGPADSPRLAALHALVVDHPIIARDVLDGMCRLSLGWQVDLAVSGEQA 1132
gi|119776084|ref|YP_928824.1|AQLN---VEQLEGMVAVLVDNSTARIDLRTLQSMGFSVDSARSAMEA 1314
gi|83593696|ref|YP_427448.1|GSESAESGR----PLRVLVVDNPNVAGGILAQTVQGLGYDCDLVQESAET 1172
*::*: : * : . . . . :

gi|241775859|ref|ZP_04773141.1|IQAVQAERAGRSFRFILMDWRIPGELDGLQTLRELHALRRLGVLKGESI 857
gi|121998929|ref|YP_001003716.1|IEKVIASERRDDPDFILMDWMPGGMSGSETCRALACRQSGDLAQRNP 1259
gi|225198924|ref|ZP_03738052.1|VDAAVVAADRAGEPYEFVFMWDMKMPGELDGLQAAREIDRLYAEGLKGNTRP 1169
gi|117926684|ref|YP_867301.1|LAKVEAAAALNDPVQVVLMDWKMP-DMDGLQTARAMQHN---DDLQELPM 2167
gi|171060213|ref|YP_001792562.1|LALMHAQAGAGNSYQAVLVDWQMP-GLDGWETARRIRER---GLDGAAP 1177
gi|119776084|ref|YP_928824.1|LEKCAER-----DYRIALIDWKMP-EMDGTETAARMRELK-----QPP 1351
gi|83593696|ref|YP_427448.1|KARIVAADAAGRPYDAVLLDWRMP-EVDGLTTARILREMG----VTLCPQ 1217
::** :* :. * : :

gi|241775859|ref|ZP_04773141.1|PALIVSAYNQDQVADH---AEYSAFLSKPVTANVLEAMRQAVSEQ-- 901
gi|121998929|ref|YP_001003716.1|PVLMSVAYDPSQIDLP---EGLTRELKSKPITANVLYQALLRAERGD-- 1303
gi|225198924|ref|ZP_03738052.1|PFVVVSAYQRELPEDS---VECFNCFLSKPVNTASSIFNAIEATG--- 1212
gi|117926684|ref|YP_867301.1|VIMVTAYGREEAVQAAT---GVELKGFLLTKPVSPSTLLDAVMGALGREGV 2214
gi|171060213|ref|YP_001792562.1|IVVMVTAHGRELQAQRSEREPVLDGFLVVKPVNTASMLFDAIADARPAQ-- 1225
gi|119776084|ref|YP_928824.1|LILMVSANHANSEFIDKV--EEMGINGYITKPI SASRLLDGIMSALGRQG- 1398
gi|83593696|ref|YP_427448.1|SIIMVTAAGRDNVLSLAEQTGDAFFDAVLTTPVTPGQLRDLRDRATS- 1266
: : : : *::*: : : :

gi|241775859|ref|ZP_04773141.1|--RATERRPVSGVRRIPCFSSERTLLLEDNALNREVATAILDKTRIRIIL 949
gi|121998929|ref|YP_001003716.1|--RAANMGPE-SMGHTPNLAGYRILIAEDNETNQEVASLLLEKTGAQVQV 1350
gi|225198924|ref|ZP_03738052.1|--KAPSYTRDDEQFTIPSFQGYISILLAEDNALNQEVAWQMLEKTGAALS 1260
gi|117926684|ref|YP_867301.1|SGRRAHERQVESEAIILLRGAKVLLVEDNEINQELALELLANAGILAKL 2264
gi|171060213|ref|YP_001792562.1|--PGPQARANGAVGLHRLLAGLRLLLVEDNPTNQVARELLTQEGAVVQI 1273
gi|119776084|ref|YP_928824.1|HKPVRRKAQPMDAQKLSGLKGRILLVEDNEMNQEVASEFLEQGLVLSI 1448
gi|83593696|ref|YP_427448.1|---EGEATALAPRGLPTPLAGRLLVVEDNAINRQVAEALLAGAGAEIDL 1313
: : *::*: : : * :

gi|241775859|ref|ZP_04773141.1|ANNQAEAVDQVGRTS--IDLVLMDLQMPVMDGFATRIRIR--ARYPELPI 995
gi|121998929|ref|YP_001003716.1|VNNGAEALEAAHEAP--PDLILMDLQMPVLDGFATRIRLR--EAGYGGPV 1396
gi|225198924|ref|ZP_03738052.1|AANGAEAVEMVEAGS--FDLVLMDLQMPVMDGFATRIRIL--ERFPDLPV 1306
gi|117926684|ref|YP_867301.1|AENGVEALQALQREP--FDGVLMDVQMPIMDGYTATREIRKQAAFKDLPV 2312
gi|171060213|ref|YP_001792562.1|ANHGEAVAVAAATRFDFVVLMDLQMPVMDGYTATRIRIRQALGLTRLP 1323
gi|119776084|ref|YP_928824.1|ADNGQIALEKLGQOS--FDLVLMDQMPVMDGYQATRELRLKLPGLAELPV 1496
gi|83593696|ref|YP_427448.1|AEGGERGVMMVLRGEIAYDAVLDLQMPDIDGFATRIRIRADARFKALPI 1363
. * : : * :*** ** :*: ** : : * :

gi|241775859|ref|ZP_04773141.1|IALSAAVMDADREQARLAGANDHVAKPIESQTVFEMLEKWLIPDGYQT-- 1043
gi|121998929|ref|YP_001003716.1|LALSAAVTEGDQQRARAAAGMGAAHIAKPIDREQLYARLADHLSPPQATDD 1446
gi|225198924|ref|ZP_03738052.1|IALSAAVMEEDRNKSRQAGMRDHLKPIESTSLYRTLARWLQAG--DSVK 1354
gi|117926684|ref|YP_867301.1|IAMTANMAADLEKAKAAGMQAHVSKPIDVREMFTTMAQWIKPSGLVVEP 2362
gi|171060213|ref|YP_001792562.1|VAMTANAMSTDREACLAAGMDDHVKGKPFIDIDLHLVQVLRROAGLAPSSIPA 1373
gi|119776084|ref|YP_928824.1|VAMTANAMAGDKEMCLLAGMNDHIAKPIEVGILYQTLLOYLCEPAKGLS 1546

```


2 Alignment AlvinDRAFT_0675

gi|241775860|ref|ZP_04773142.1: *Allochrochromatium vinosum* DSM 180
 gi|225198925|ref|ZP_03738053.1: *Desulfonatronospora thiodismutans* ASO3-1
 gi|121997174|ref|YP_001001961.1: *Halorhodospira halophila* SL1
 gi|117926802|ref|YP_867419.1: *Magnetococcus* sp. MC-1
 gi|153873478|ref|ZP_02002049.1: *Beggiatoa* sp. PS
 gi|196255276|ref|ZP_03153815.1: *Cyanothece* sp. PCC 7822
 gi|119773886|ref|YP_926626.1: *Shewanella amazonensis* SB2B

Die konservierten Bereiche um den Aspertatrest der REC-Domäne (gelb) und die GGDEF-Domäne (hellgrün) sind markiert.

```

gi|225198925|ref|ZP_03738053.1|-MSSDET-----KEKRSVLIVDDQPDN- IHALGKLIKDEYRIMAATSGA 42
gi|121997174|ref|YP_001001961.1|MMHEDPL-----PQWPTILIVDDDEPTN- IQALAHLLKDDYHIRVATGGA 43
gi|241775860|ref|ZP_04773142.1|-MSDS-----KQATILIVDDQPAN- IHALAALLKKDYRILTATRGE 39
gi|117926802|ref|YP_867419.1|-MNHGKRPS--GGERPTIMIVDDEKIN- IDVLTSLKADYRIIAAKTGA 46
gi|153873478|ref|ZP_02002049.1|-MTN-----HVKQKILIVGDVVSANAQELIESLKSPNYDIVVATTGE 40
gi|196255276|ref|ZP_03153815.1|-MNNYCS----IQTEPVSVLIVDDDPFTQMQLRLYLQRENYRLIITNNGK 45
gi|119773886|ref|YP_926626.1|-MINQEQQPFKGSDDGPPKVLIVDDKPSN- IQIVHHI IKDQYQVLMATSGK 48
*          . : : * . * . . . :          : * : . : *

gi|225198925|ref|ZP_03738053.1|RALEIAESDNPPDLIILLDVMMPEMDGYEVCRRLLKRNEKTNISIPVIFVTAM 92
gi|121997174|ref|YP_001001961.1|KALEIAAGTQPQDLIILLDVMMPEPDGYEICRRLKADRATQNIPIVFTGR 93
gi|241775860|ref|ZP_04773142.1|KALELAARTPPPDLIILLDIVMPDMGHEVCCRLKNDEATKAIP IIFVTAL 89
gi|117926802|ref|YP_867419.1|QAQNRQLQKGLLPDLIILLDISMPELDGYEVCRLKEDPRSRDVPVIFITSR 96
gi|153873478|ref|ZP_02002049.1|AALD-TITSTHPDLIILLDITMPEIDGYEICAKLKAETTQKIPVIFFFAT- 88
gi|196255276|ref|ZP_03153815.1|EGLK-AYHQYHPDLVLLDAVMPMDGFECQQLMQLPGAETPILMITSL 94
gi|119773886|ref|YP_926626.1|RAIE-ICLEMLPDLVLLMIVIMPELSGLDTCKLMKQHPDELVNIPIVIFTGL 97
. .          * : : * * * : . * : * :          * : : :

gi|225198925|ref|ZP_03738053.1|DSAEEDEETGFNLGAVDYISKPFKPTIVRARIK-----NQMLNKIKTDM 135
gi|121997174|ref|YP_001001961.1|DSAADEEHGLELGAMDYITKPFSPRITRTRVR-----NHVDLKRKTD 136
gi|241775860|ref|ZP_04773142.1|GEERDEEHGLNLGAADYISKPFSPAIVRARVR-----NQIHLKLRTRD 132
gi|117926802|ref|YP_867419.1|HGDDDEVQGFVEGAVDYIRKPFHPLVVRSRIK-----THIDLKRHGDM 139
gi|153873478|ref|ZP_02002049.1|-PEDDKTKGLKVGAMDYITKPICAPLVKVRVN-----NYLMLKKQTD 130
gi|196255276|ref|ZP_03153815.1|DDQQSVDQAFAVGATDYVTKPIHWPVLRQVRRLHQQVRLQQLEAANEK 144
gi|119773886|ref|YP_926626.1|QQQHDEENACWDAGGVDFISKPFNATTLKNRIK-----AQVTLKRQSDL 140
.          * . : : * * :          : * : .          * : :

gi|225198925|ref|ZP_03738053.1|LEKLSMQDGLTEIPNRRFFEENLAREWSRCMRNGLPLSQLIMDIDNFKPY 185
gi|121997174|ref|YP_001001961.1|LERLSQRDGLTDLNRRVLDRLPPEEWSRCQRGDTPLSVIMMDIDHFKPY 186
gi|241775860|ref|ZP_04773142.1|LEQVAMQDGLTQIPNRRRFDQKLREEWARLIRPDQSLSLMLDIDIDQFKPY 182
gi|117926802|ref|YP_867419.1|LKQLAIMDGLTGIANRRRFDQFVDYEWRSRLRYQHNFSLIMLIDIDYFKRF 189
gi|153873478|ref|ZP_02002049.1|LEHLSDIDSLTGISNRRSLDEFMEQEWRRRAIRGISHLSLIMIDIDHFLQF 180
gi|196255276|ref|ZP_03153815.1|LQRLVSIDGLTQIHNRRRFDCEIQFEWQRLAREEQWLALIFIDIDYFKLY 194
gi|119773886|ref|YP_926626.1|LRRLAFLDGLTGKVRNRRFFDQYLETQLMLARRQSQAIQVLMVDIDYFKQY 190
* . : : * . * : * * : . : :          : * . : : * * * * :

gi|225198925|ref|ZP_03738053.1|NDNYGHGAGDDCLKVKVANVIKNTLSRPTDLAARYGGEEFVVLLPETHAAG 235
gi|121997174|ref|YP_001001961.1|NDHYGHGAGDECLRRVARVLANVPSRTDVLVARYGGEEFIALLPYTDAPD 236
gi|241775860|ref|ZP_04773142.1|NDHYGHGAGDECLRQVAQALYQVQRPADLVARYGGEEFVAVLPETDETG 232
gi|117926802|ref|YP_867419.1|NDCYGHAGQDQCLKQVAYAISQAMPMPMDLAARYGGEEFACVLPETSREG 239
gi|153873478|ref|ZP_02002049.1|NEHYGYVTGDECLKQVATALAQAERSTDLIARYEGDQFACVLPETNAKG 230
gi|196255276|ref|ZP_03153815.1|NDTYGHQAGDHCLQVQATIQTQNTLQRPADFAARYGGEEFVAVLPETHLAG 244
gi|119773886|ref|YP_926626.1|NDSFGHQMGDEALRSVAQALGESCRRPADLVARYGGEEFVVVLPNTPKNG 240
* : : : * * . * : * * : . :          : * . * : * * * * : * * *

gi|225198925|ref|ZP_03738053.1|AVHVAEELRAAVQQLGITHEHSPTASVVTISVGTSTHSAESPMKNKEQLL 285
gi|121997174|ref|YP_001001961.1|AWQMAERFRAAVAALQLPHGHSSTDGIITMSVGVASHTADRPYDSPEQLL 286
gi|241775860|ref|ZP_04773142.1|AEHLARLLESVQALGIEHDYSDVAPQVSVSIGVATHSPRRRPSDAEALK 282
gi|117926802|ref|YP_867419.1|AVTVANRVLQGVQELRAHAHNSVANHVTVSVGIASMPV-RSEDIPTTLL 288
gi|153873478|ref|ZP_02002049.1|ATVMANKLRESIISENIPHAHSIIADHITISQGIATRPP-YPNSSPSLLI 279
gi|196255276|ref|ZP_03153815.1|AKKVAEKIRFNIENLHPIHQKSSVSVQVWSASLVGVVCLIP-DAQETPKQLI 293
gi|119773886|ref|YP_926626.1|VERVIERIQGATAELDIHHPASATG-ILTVSMGGMIWLA--DYQSTEALL 287
. : . . .          : * * *          : : * *          . . .          *

gi|225198925|ref|ZP_03738053.1|QLADEALYQAKESGRNRVQSSYLDW----- 310
gi|121997174|ref|YP_001001961.1|EAADQALYAACKAGRNRVQAAQ----- 308
gi|241775860|ref|ZP_04773142.1|QSADRALYQAKSQGRNRVVSFE----- 303
  
```

```
gi|117926802|ref|YP_867419.1| ARADQALYHAKNSGRNQLHYLE----- 310
gi|153873478|ref|ZP_02002049.1| ADAKKALGEAKRRGGNQIRNLD----- 301
gi|196255276|ref|ZP_03153815.1| KKADQALYQAKLQGRNCLVTVDESQILAIIP 324
gi|119773886|ref|YP_926626.1| GEADKLLYRAKSLGRNRACIDANIP----- 312
*..* ** *
```


DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bedanken:

- ◆ bei apl. Prof. Dr. Christiane Dahl, für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes am IfMB, die vielen wissenschaftlichen Anregungen, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und das geduldige Korrigieren meiner Manuskripte. Besonders herzlich möchte ich mich darüber hinaus dafür bedanken, dass sie mein Promotionsvorhaben immer vorbehaltlos unterstützt hat und jederzeit bereit war, für sich ergebende Verwaltungsprobleme eine schnelle und unbürokratische Lösung zu finden.
- ◆ bei Prof. Dr. Dr. Alexander Prange für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes in der Abteilung Mikrobiologie & Lebensmittelhygiene an der Hochschule Niederrhein, die vielen wissenschaftlichen Anregungen, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit, drei Forschungsaufenthalte an der Louisiana State University und der Louisiana Tech University zu verbringen. Zudem bedanke ich mich für die Messung eines Teils der XANES-Spektren sowie seine Unterstützung bei den selbst durchgeführten Messungen. Auch bei ihm möchte ich mich besonders herzlich für die vorbehaltlose Unterstützung meines Promotionsvorhabens und seinen unermüdlichen Einsatz in Bezug auf meine Anstellung an der Hochschule Niederrhein bedanken.
- ◆ bei Prof. Dr. Uwe Deppenmeier für die freundliche Übernahme des Korreferates.
- ◆ bei Prof. Dr. Josef Hormes für die Einladung zu einem Forschungsaufenthalt ans CAMD im Frühjahr 2006, die vielen nützlichen Anregungen zu meinen Manuskripten und die Teilnahme an der Promotionskommission trotz der weiten Anreise.
- ◆ bei Prof. Dr. Yuri M. Lvov für die Einladung ans IfM, sein Interesse an meiner Arbeit dort und seine Sorge um mein Wohlergehen in Ruston.
- ◆ bei den ehemaligen Dekanen und dem derzeitigen Dekan des Fachbereich 05 der Hochschule Niederrhein Prof. Dr. Peter Kronsbein, Prof. Dr. Reinhard Hambitzer und Prof. Dr. Günther Wentzlaff für die Unterstützung meiner Anstellung an der Hochschule Niederrhein.
- ◆ bei Simone Waclawek für die Durchführung der Fermenter zur Schwefelaufnahme von *Hlr. Abdelmalekii* und die Inhibitorversuche zu IAA. Besonders bedanken möchte ich mich bei ihr dafür, dass sie, wann immer es nötig war, hilfsbereit eingesprungen ist, es geschafft hat, die HPLC zuverlässig in Gang zu halten, für die unglaublichen Mengen HPLC-Puffer, die sie unter nur leichtem Murren für mich angesetzt hat und für ihre ansteckend fröhliche Art, durch die mir die Zusammenarbeit mit ihr sehr viel Spaß gemacht hat.
- ◆ bei Dr. Henning Lichtenberg für das Fitten der XANES-Spektren - bei Bedarf auch nachts - obwohl er sicher auch mit seiner eigenen Dissertation genug zu tun gehabt

hätte, interessante Gespräche über XANES, seine große Hilfsbereitschaft während meiner Aufenthalte am CAMD und die Einführung in die Baton Rouge Esskultur.

- ◆ bei Shantanu S. Balkundi für die gute Zusammenarbeit beim Einkapseln von Bakterien am IfM, seine große Hilfsbereitschaft während meines Aufenthaltes in Ruston und die aufwendige Organisation einer tollen Abschiedsparty.
- ◆ bei Birgitt Hüttig für die Durchführung der Fermenter zur Schwefelaufnahme von *Tca. roseopersicina* und *Hlr. halophila*.
- ◆ bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Schwefelarbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen anregenden Diskussionen. Besonders bedanken möchte ich mich hier bei Frauke Grimm, Fabian Grein, Yvonne Stockdreher, Lydia Kammler, Simone Waclawek und Renate Zigann, die dafür gesorgt haben, dass ich mich in Bonn von Anfang an heimisch gefühlt habe und immer gerne an die gemeinsame Zeit im Labor zurückdenken werde.
- ◆ bei Lydia Kammler und Nadine Dobler, die im Rahmen eines Laborblocks an der Untersuchung der Sulfitoxidation in *Alc. vinosum* mitgearbeitet haben.
- ◆ bei Zhiguo Zheng und Dr. Karen Xu für ihre Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen.
- ◆ bei allen Mitarbeitern des IfMB der Universität Bonn für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft bei allen kleineren und größeren Problemen. Dafür bedanke ich mich auch bei den Mitarbeitern des Fachbereichs 05 der Hochschule Niederrhein und hier besonders bei Andrea Finken, Gabi Hoschek und Walter Traxel.
- ◆ bei Chris M. Bianchetti, Russell 'Rusty' Louis und Gregory Merchan für ihre technische Unterstützung während der Messungen am CAMD.
- ◆ bei Dr. Bernd Masepohl für die Bereitstellung der Vektoren pPHU234, pPHU235 und pPHU236.
- ◆ bei Dr. Stephanie Markert für die Protokolle zur 2D-Gelelektrophorese und viele hilfreiche Tipps zu diesem Thema.
- ◆ bei Dustin Green für seine große Hilfsbereitschaft während meines Aufenthaltes in Ruston und besonders für die Ausstattung meines Zimmers mit zumindest dem Nötigsten.
- ◆ bei Broder Rühmann und Anke Carius für ihre schnellen und zuverlässigen „Paperlieferungen“ und ihre ständige Diskussionsbereitschaft.
- ◆ bei Jörg, der die Zeit in den letzten Monaten dieser Arbeit noch l(i)ebenswerter gemacht hat.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Artikel

Franz B, Lichtenberg H, Hormes J, Modrow H, Dahl C & Prange A 2007. Utilization of solid ‘elemental’ sulfur by the phototrophic purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: a sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy study. *Microbiology-UK* **153**: 1268–1274.

Franz B, Gehrke T, Lichtenberg H, Hormes J, C Dahl & Prange A 2009. Unexpected extracellular and intracellular sulfur species during growth of *Allochromatium vinosum* with reduced sulfur compounds. *Microbiology-UK* **155**: 2766–2774.

Franz B, Balkundi SS, Dahl C, Lvov YM & Prange A 2009. Layer-by-Layer Nano-Encapsulation of Microbes: Controlled Cell Surface Modification and Investigation of Substrate Uptake in Bacteria. *Macromol. Biosci.* DOI: 10.1002/mabi.200900142.

Franz B, Lichtenberg H, Hormes J, Dahl C & Prange A 2009. The speciation of soluble sulphur compounds in bacterial culture fluids by X-ray absorption near edge structure spectroscopy. *Environ. Technol.* **30**: 1281-1289.

Franz B, Lichtenberg H, Dahl C, Hormes J & Prange A 2009. Utilization of ‘elemental’ sulfur by different phototrophic sulfur bacteria (*Chromatiaceae*, *Ectothiorhodospiraceae*): A sulfur K-edge XANES spectroscopy study. *J. Phys.: Conference Series* **190**, DOI:10.1088/1742-6596/190/1/012200

Review

Grimm F, Franz B & Dahl C 2008. Thiosulfate and sulfur oxidation in purple sulfur bacteria. In *Microbial Sulfur Metabolism*, Dahl C & Friedrich CG eds., Springer, Berlin, pp. 101–116.

Posterbeiträge

Franz B, Hensen D & Dahl C 2006. The role of Sox proteins in sulfide and sulfite oxidation in *Allochromatium vinosum*. VAAM-Jahrestagung, Jena, 19.-22.03.2006.

Franz B, Prange A, Modrow H, Hormes J & Dahl C 2006. Uptake of elemental sulfur in *Allochromatium vinosum*. International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism (ISMSM), Münster, 29.06.-02.07.2006.

Franz B, Hensen D & Dahl C 2006. The role of the Sox multienzyme system in sulfide and sulfite oxidation in *Allochromatium vinosum*. International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism (ISMSM), Münster, 29.06.-02.07.2006.

Franz B, Prange A, Modrow H, Hormes J & Dahl C 2006. Elemental sulfur oxidation in *Allochromatium vinosum*. 12th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (ISPP), Pau, Frankreich, 27.08-01.09.2006.

Franz B, Lichtenberg H, Hormes J, Modrow H, Dahl C & Prange A 2007. Utilization of elemental sulfur by *Allochromatium vinosum*. VAAM-Jahrestagung, Osnabrück, 01.-04.04.2007.

Franz B, Lichtenberg H, Hormes J, Dahl C & Prange A 2008. Speciation analysis of supernatants of *Allochromatium vinosum* cultures grown on different reduced sulfur compounds. VAAM-Jahrestagung, Frankfurt am Main, 09.-11.03.2008.

Balkundi SS, Franz B, Dahl C, Lvov YM & Prange A 2009. Polyelectrolyte Nanoencapsulation of Bacteria through LbL Assembly. VAAM-Jahrestagung, Bochum, 08.-11.03.2009

Franz B, Welte C, Hafner S, Krätzer C, Quentmeier A, Friedrich CG & Dahl C 2009. Regulation and *in vitro* activity of the thiosulfate-oxidizing Sox system of *Allochromatium vinosum*. EMBO Workshop on Microbial Sulfur Metabolism (WMSM), Tomar, Portugal, 15.-19.03.2009.

Franz B, Lichtenberg H, Dahl C, Hormes J & Prange A 2009. A XANES spectroscopy study: Influence of sulfur speciation on elemental sulfur uptake in phototrophic bacteria. 14th International Conference on X-ray Absorption Fine Structure (XAFS14), Camerino, Italien, 26.-31.07.2009.