

**Biochemische Untersuchungen zum DsrC Protein und zum  
DsrEFH Heterohexamer von  
*Allochromatium vinosum***

Dissertation

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

vorgelegt von  
Ute Selan  
aus  
Wevelinghoven

Bonn 2009

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

1. Referentin:           apl. Prof. Dr. Christiane Dahl  
2. Referent:             Prof. Dr. Jobst Klemme

Tag der Promotion: 17. Februar 2010  
Erscheinungsjahr: 2010

## INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	i
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	iv
1. Einleitung .....	1
1.1 Schwefelvorkommen.....	1
1.2 Schwefelstoffwechsel.....	2
1.3 <i>Allochromatium vinosum</i> .....	3
1.4 Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen in <i>A. vinosum</i> .....	4
1.4.1 A. Oxidation von Sulfid ( $S^{2-}$ ) zu elementarem Schwefel ( $S^0$ ), der innerhalb der Zelle gespeichert wird .....	5
1.4.2 Schwefelkugeln mit gespeichertem Schwefel der Oxidationsstufe 0.....	6
1.4.3 B. Oxidation von elementarem Schwefel ( $S^0$ ) zu Sulfit ( $SO_3^{2-}$ ).....	8
1.4.4 C. Oxidation von Sulfit ( $SO_3^{2-}$ ) zu Sulfat ( $SO_4^{2-}$ ) .....	8
1.5 Das <i>dsr</i> -Operon .....	9
1.6 Cystein .....	16
1.7 Zielsetzung.....	16
2 Material und Methoden .....	18
2.1 Material .....	18
2.1.1 Chemikalien.....	18
2.1.2 DNA-und Protein-Marker .....	18
2.1.3 Enzyme.....	18
2.1.4 Nährmedien und Antibiotika .....	18
2.1.5 <i>E. coli</i> -Stämme.....	19
2.1.5.1 <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	19
2.1.5.2 <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	19
2.1.6 Plasmide.....	19
2.1.7 Geräte.....	20
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	21
2.2.1.1 Anzucht von <i>E. coli</i> .....	21
2.2.1.1.1 Vorkulturen.....	21
2.2.1.1.2 Hauptkulturen für Plasmidisolierung und Proteingewinnung .....	21
2.2.1.2 Zellernte .....	21
2.2.1.3 Herstellung $CaCl_2$ -kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	22
2.2.1.4 Calciumchlorid-Transformation von <i>E. coli</i> Zellen.....	22
2.2.2 Molekulargenetische Arbeiten .....	23
2.2.2.1 Isolation der Plamid- DNA aus <i>E. coli</i> .....	23
2.2.2.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA .....	23
2.2.2.3 Agarose –Gelelektrophorese .....	24
2.2.2.4 Rückgewinnung von DNA aus Agarosegelen .....	24
2.2.2.5 Restriktionsanalyse zur Klonierung und zur Identifizierung gewünschter Klone .....	25
2.2.2.6 Ligation mit T4-Ligase.....	25
2.2.2.7 Sequenzanalyse der DNA .....	25

2.2.2.8	Amplifikation der DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	25
2.2.2.8.1	Zielgerichtete Mutagenese (site directed mutagenesis) .....	26
2.2.2.8.1.1	Oligonukleotide.....	26
2.2.2.8.1.2	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase .....	27
2.2.2.8.1.3	PCR-Ansatz.....	27
2.2.2.8.1.4	PCR Temperaturprogramm.....	28
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	30
2.2.3.1	Expression der rekombinanten löslichen Proteine DsrC, DsrC C100S, DsrC C111S und DsrC C100S/C111S.....	30
2.2.3.2	Quantitative Proteinbestimmung mittels UV-Spektroskopie .....	31
2.2.3.3	Analyse von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	31
2.2.3.3.1	Herstellung des Gels .....	31
2.2.3.3.2	Durchführung der Elektrophorese.....	32
2.2.3.4	Analyse von Proteinen in Abwesenheit von SDS, mittels nativer Elektrophorese.....	33
2.2.3.5	Coomassie Färbung.....	34
2.2.3.6	Aufreinigung des Proteins .....	35
2.2.3.6.1	Zellaufschluss und Gewinnung des löslichen Gesamtzellproteins.....	35
2.2.3.6.2	Affinitätschromatographie an Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose.....	35
2.2.3.6.3	Dialyse der Eluate .....	36
2.2.3.6.4	Aufkonzentrierung der Proteindialysate .....	37
2.2.3.6.5	Gelfiltrationschromatographie .....	37
2.2.3.7	Chemische Modifikation der Proteinkonzentrate mit Jodacetamid .....	39
2.2.3.8	Inkubation von rekombinantem DsrEFH mit rekombinantem DsrC, sowie seinen rekombinanten mutierten DsrC C100S, DsrC C111S und DsrC C100S/C111S Proteinen.....	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Konstruktion der Vektoren.....	41
3.1.2	Zielgerichtete Mutagenese zur Herstellung der Mutanten <i>dsrC C100</i> , <i>dsrC C111</i> und <i>dsrC C100/111</i> .....	41
3.1.2.1	pET15b <i>dsrC C100</i> .....	43
3.1.2.2	pET15b <i>dsrC C111</i> .....	46
3.1.2.3	pET15b <i>dsrC C100/C111</i> .....	47
3.2	Expression und Aufreinigung der verschiedenen Formen des DsrC Proteins .....	48
3.2.1	Expression.....	48
3.2.2	Reinigung des DsrC Proteins, sowie seiner Mutanten DsrC C100S, DsrC C111S und DsrC C100S/111S mittels Affinitätschromatographie .....	49
3.2.2.1	SDS-PAGE zur Überprüfung der Eluate aus der Affinitätschromatographie .....	49
3.2.2.1.1	SDS-PAGE des rekombinanten DsrC Proteins.....	49
3.2.2.1.2	SDS-PAGE des rekombinanten mutierten DsrC C100S Proteins .....	50
3.2.2.1.3	SDS-PAGE des rekombinanten mutierten DsrC C 111S Proteins .....	52
3.2.2.1.4	SDS-PAGE des rekombinanten mutierten DsrC C100S/C111S Proteins.....	53
3.2.3	Weitere Aufreinigung der Proteine mit der Gelfiltration.....	54
3.2.3.1	Gelfiltration des rekombinanten DsrC Proteins .....	55
3.2.3.2	Gelfiltration des rekombinanten mutierten DsrC C100S Proteins .....	57
3.2.3.3	Gelfiltration des rekombinanten mutierten DsrC C111S Proteins .....	59
3.2.3.4	Gelfiltration des rekombinanten mutierten DsrC C100S/C111S Proteins .....	60
3.2.4	Verteilungen der monomeren und der dimeren Form der verschiedenen DsrC Proteine im SDS-Gel und in der Gelfiltration .....	62
3.3	Untersuchungen des DsrC Proteins, sowie seiner mutierten Proteine mittels Alkylierung durch Jodacetamid.....	63
3.3.1	Auswirkungen der Alkylierung auf das DsrC Protein, sowie seine mutierten Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen .....	63
3.3.2	Auswirkungen der Alkylierung auf das DsrC Protein, sowie seine mutierten Proteine unter reduzierenden Bedingungen .....	67
3.4	Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen dem DsrC Protein, sowie seinen mutierten Proteinen mit dem rekombinanten DsrEFH Proteinkomplex .....	69

3.4.1	Titrationssreihe des monomeren DsrC Proteins zur Interaktion mit dem DsrEFH Proteinkomplex.....	70
3.4.2	Gegenüberstellung der Wechselwirkungen der monomeren und der dimeren Form des DsrC Proteins mit dem DsrEFH Proteinkomplex .....	71
3.4.3	Optimierung der Wechselwirkungen zwischen DsrEFH Proteinkomplex und DsrC Monomer durch zusätzliche Gabe von TCEP .....	73
3.4.4	Optimierung der Wechselwirkungen zwischen DsrEFH Proteinkomplex und DsrC Dimer bei zusätzlicher Gabe von TCEP.....	75
3.4.5	Wechselwirkungen der mutierten Formen DsrC C100S Monomer, DsrC C111S und DsrC C100S/C111S mit dem DsrEFH Proteinkomplex .....	77
4	Diskussion .....	80
4.1	Die Generierung der drei Konstrukte pET15b dsrC C100, pET15b dsrC C111 und pET15b dsrC C100/C111.....	81
4.2	Die mutierten DsrC Proteine werden korrekt gefaltet .....	82
4.3	Die mutierten DsrC Proteine bieten konkrete Anhaltspunkte hinsichtlich des Cysteins, welches an der Dimerisierung beteiligt ist .....	83
4.4	Modelle zur Disulfidbrückenbildung der verschiedenen DsrC Proteine erläutert an Hand der Alkylierungsergebnisse .....	84
4.5	Erste Anhaltspunkte für die Ursachen der intra-und intermolekularen Disulfidbrückenbildung .....	91
4.6	Inkubationen zwischen DsrC, sowie DsrC C100S mit dem DsrEFH Proteinkomplex führen zu dessen Konformationsänderung .....	94
4.7	Mögliche Funktionen des DsrC Proteins und des DsrEFH Proteinkomplexes .....	94
5	Zusammenfassung .....	98
6	Literatur .....	99

---

**Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
DMS	Dimethylsulfid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]-piperazin-N´-[2-ethan-sulfonsäure]
IPTG	Isopropyl-β-S-thiogalaktosid
kDa	Kilodalton
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinnukleotid-Phosphat
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Pikomol
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH-Gruppe	Sulfhydrylgruppe
TCEP	Tris (2-carboxyethyl) phosphine
TEMED	Tetramethyldiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)

# 1. Einleitung

## 1.1 Schwefelvorkommen

Schwefel und seine zahlreichen Verbindungen haben eine beachtliche Bedeutung für Natur und Mensch. Das Spektrum reicht vom ökonomischen, ökologischen bis hin zum wissenschaftlichen Nutzen. Schwefel gehört zu den häufigeren Elementen der festen Erdkruste. Ursprünglich war fast aller Schwefel als Pyrit ( $\text{FeS}_2$ ) in den Primärgesteinen gebunden (Wächtershäuser, 2002). Durch Ausgasen der Erdkruste und später durch Verwitterung unter aeroben Bedingungen erfolgte ein Transport großer Mengen des Schwefels als Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Das Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) im Ozean gehört mit zu den derzeit größten Schwefelreservoirs. Die leichtflüchtige Schwefelverbindung Dimethylsulfid (DMS), ein Abgabeprodukt des marinen Phytoplanktons, wurde in den 70er Jahren in der ozeannahen Luftschicht entdeckt (Maroulis und Bandy, 1977; Lovelock et al., 1972). Die Dimethylsulfid Exhalation liefert im globalen Maßstab den größten Beitrag zur natürlichen Emission gasförmiger Verbindungen (Berresheim et al., 1995). Am Aufbau der Erdkruste hat Schwefel einen Anteil von 0,05 Gewichtsprozent. Schwefel kommt in sehr unterschiedlichen Arten vor. Sowohl im elementaren wie im gebundenen Zustand ist er weit verbreitet. Auf der einen Seite des Spektrums steht die ökonomische Bedeutung. Wirtschaftlich bedeutsam sind die sedimentär entstandenen Lagerstätten. Dazu gehören die jungtertiären Lager elementaren Schwefels in Polen. Die größten dieser Lagerstätten sind in den USA (Texas, Louisiana). Der Elementarschwefel in diesen geologischen Lagerstätten wird auf die Aktivität von Sulfat reduzierenden Bakterien zurückgeführt. An die Aktivität dieser Sulfat reduzierenden Bakterien schließt sich ein Oxidationsschritt an, der vermutlich durch chemotrophe Bakterien zustande kommt (Dahl und Prange, 2006). Im Unterharz (Elbingerode) wird das schwefelhaltige Mineral Pyrit zur Schwefelgewinnung abgebaut. Ökonomisch wichtiger ist aber der Schwefelgehalt vieler Braunkohlen. Postvulkanische Dampfquellen mit hohem  $\text{H}_2\text{S}$ -Gehalt und Temperaturen unter  $200^\circ\text{C}$  finden sich bei Neapel. In diesen Dampfquellen bildet sich durch die Oxidation des  $\text{H}_2\text{S}$  bei Zutritt des Luftsauerstoffs freier Schwefel.

Auf der anderen Seite des Spektrums steht die starke Involvierung in ökologische Stoffkreisläufe. Wie nachfolgend erläutert, ist Schwefel für alle Organismen essentiell. Er ist ein funktionsbedingt wichtiges Element der lebenden Materie.

## 1.2 Schwefelstoffwechsel

Der Schwefel macht bei den Zellproteinen einen konstanten Anteil aus. Bemerkenswert sind die vielen Oxidationszustände des Schwefels, das heißt, er kann insgesamt neun Oxidationsstufen einnehmen. Von dieser Vielzahl der möglichen Oxidationsstufen des Schwefels dominieren die drei Stufen -2, 0 und +6. Sulfid ist dabei am stärksten reduziert mit der Oxidationsstufe -2. Ihm gegenüber steht Sulfat, welches mit der Oxidationsstufe +6 am stärksten oxidiert ist (Steudel, 2000). Aufgrund der besonderen Beschaffenheit des Schwefels, Bindungen schnell einzugehen und wieder zu lösen, erhalten eine große Zahl von Biomolekülen bedeutende Funktionsweisen. Ebenso dient Schwefel als Elektrophil beispielsweise in Disulfiden und als Nukleophil beispielsweise als Thiol.

Zu den schwefelhaltigen Verbindungen zählen die Aminosäuren Cystein und Methionin weitere schwefelhaltige Verbindungen sind Biotin, Coenzym A, Sulfolipide und Nichthäm-Eisenproteine (z.B. Ferredoxin). Menschen und Tiere nehmen Schwefel vorwiegend mit den schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin auf. Diese beiden Aminosäuren enthalten Schwefel in reduzierter Form als Sulfidgruppe. Schwefel wird in der Zelle in der Regel in reduzierter Form in die organischen Verbindungen eingebaut. Zur Biosynthese der oben erwähnten schwefelhaltigen Zellkomponenten wird eine assimilatorische Sulfatreduktion durchgeführt. Zu dieser „Assimilation des Schwefels“ sind nur Bakterien, Pilze und grüne Pflanzen befähigt (Dahl et al., 2002).

Dieser „Assimilation des Schwefels“ steht die „Dissimilation des Schwefels“ gegenüber. Der dissimilatorische Schwefelstoffwechsel lässt sich nochmals unterteilen und zwar in einen oxidativen Teil (dissimilatorische Oxidation von Schwefelverbindungen) und einen reduktiven Teil (dissimilatorische Reduktion von Schwefelverbindungen).

Im reduktiven Teil dienen anaeroben, dissimilatorischen Sulfat- und Schwefelreduzierern Sulfat, Schwefel, Thiosulfat, Sulfit oder Polysulfide als terminale Elektronenakzeptoren einer anaeroben Atmungskette in der Sulfid entsteht (Brüser et al., 2000). Die anaerobe Atmung kommt sowohl bei Bakterien als auch bei Archaeen vor. Sie ist eine sehr alte Form der Energiegewinnung, die noch aus der Zeit stammt als Sauerstoff in der Atmosphäre nur in Spuren vorhanden war.

Im oxidativen Teil des dissimilatorischen Schwefelstoffwechsels, dienen Prokaryoten reduzierte Schwefelverbindungen als Elektronendonoren. Prokaryoten, die Schwefelverbindungen oxidieren, lassen sich wiederum verschiedenen Gruppen zuordnen. Zum einen die chemotrophen Schwefeloxidierer und zum anderen die phototrophen Schwefeloxidierer. Zu den chemotrophen Schwefeloxidierern, die auch als farblose Schwefelbakterien bezeichnet werden, zählen die Gattungen *Thiobacterium*, *Achromatium*, *Beggiatoa*, *Thioploca* sowie die Archaea *Acidianus* und *Sulfolobus*. Die phototrophen Schwefeloxidierer werden in mehrere Gruppen unterteilt wie z.B. die Schwefelpurpurbakterien (*Chromatiaceae* und *Ectothiorhodospiraceae*), grüne Schwefelbakterien (*Chlorobiaceae*), Vertreter der „schwefelfreien“ Purpurbakterien (*Rhodospirillaceae*) und der grünen gleitenden Bakterien (*Chloroflexaceae*). Die grünen Pflanzen, Algen und die Cyanobakterien nutzen Wasser als Elektronendonator für ihre Photosynthese, dabei produzieren sie molekularen Sauerstoff. Sie benutzen sowohl das Photosystem I als auch das Photosystem II. Die Cyanobakterien betreiben als einzige Bakteriengruppe eine oxygene Photosynthese. Dem gegenüber stehen die Schwefelpurpurbakterien (*Chromatiaceae* und *Ectothiorhodospiraceae*), die grünen Schwefelbakterien (*Chlorobiaceae*), die schwefelfreien Purpurbakterien (*Rhodospirillaceae*), filamentöse Anoxyphotobakterien (*Chloroflexaceae*) und die *Heliobacteria* (Kondratieva et al., 1992; Imhoff et al., 2005). Sie betreiben eine anoxygene Photosynthese unter anoxischen Bedingungen, damit stellen sie Relikte aus einer sauerstofffreien Urzeit dar. Für ihre Photosynthese verwenden sie an Stelle von Wasser reduzierte Schwefelverbindungen (wie Sulfid, Thiosulfat) oder Wasserstoff als Elektronendonoren. Die Purpurbakterien und die *Chloroflexaceae* besitzen das Photosystem II, allerdings ohne Wasserspaltungskomplex. Die *Chlorobiaceae* und die Heliobakterien besitzen das Photosystem I.

### 1.3 *Allochromatium vinosum*

*Allochromatium vinosum* ist ein anoxygenes Schwefelpurpurbakterium. Es gehört der  $\gamma$ -Gruppe der Proteobakterien an und ist ein Mitglied der Familie der *Chromatiaceae* (Imhoff et al., 1998). Gemeinsam mit den *Ectothiorhodospiraceae* bilden die *Chromatiaceae* die Schwefelpurpurbakterien. *A. vinosum* wird aufgrund seines Zellwandaufbaues den Gram-negativen Bakterien zugeordnet. Von der Morphologie her ist *Allochromatium vinosum* stäbchenförmig und polar begeißelt mit einer ungefähren Größe von 2  $\mu\text{m}$ . Es besitzt keine Gasvesikel und hat ein vesikuläres, intracytoplasmatisches Membransystem. Innerhalb dieses

Membransystems liegen der Photosyntheseapparat und das photosynthetische Pigment Bacteriochlorophyll *a*. Zu seinen natürlichen Lebensräumen zählen stehende Süß- und Salzwässer, die schwefelwasserstoffhaltig sind (Pfennig und Trüper, 1989). In Tiefen, in denen kaum Infrarotlicht durchdringt, sondern nur noch etwas Blau- und Grünlicht (450-550 nm), absorbieren die tiefrotgefärbten Carotinoide der Purpurbakterien, die ihnen ihre charakteristische Farbe verleihen (Fuchs, 2006).

*A. vinosum* ist in der Lage photoorganotroph und photolithoautotroph zu wachsen. Umstritten ist jedoch ein chemolithoautotrophes Wachstum (Kämpf und Pfennig, 1980). *A. vinosum* ist nicht nur auf reduzierte Schwefelverbindungen angewiesen. Es ist genauso in der Lage für die Photosynthese Wasserstoff oder einfache organische Moleküle als Elektronendonoren zu verwenden.

Die gerade in der letzten Zeit entwickelten Methoden zur molekulargenetischen Analyse von *Allochromatium vinosum*, haben die Forschung an diesem Schwefelpurpurbakterium erheblich vereinfacht und beschleunigt. Aufgrund seiner genetischen Manipulierbarkeit hat *A. vinosum* einen erheblichen Vorteil gegenüber anderen Schwefelpurpurbakterien (Pattaragulwanit und Dahl, 1995).

## **1.4 Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen in *A. vinosum***

In den folgenden Absätzen spielen die verschiedensten Schwefelverbindungen in ihrer Funktion und Bedeutung für *A. vinosum* eine zentrale Rolle. Zum besseren Verständnis gibt die Abbildung 1.1 einen kurzen Überblick sowohl zu den Strukturformeln als auch zur Oxidationszahl der jeweiligen Schwefelverbindung.

Sulfid ( $S^{2-}$ ), Hydrosulfid $HS^-$ <b>-2</b>	b) polymerer elementarer Schwefel ( $S)_n$ <b>0</b>
Disulfid <b>-1</b>	Sulfit ( $SO_3^{2-}$ ) <b>+4</b>
Polysulfide $\text{S}-(S)_n-\text{S}^-$ innerer S; terminaler S <b>0</b> <b>-1</b>	Thiosulfat ( $S-SO_3^{2-}$ ) Sulfan S; Sulfon S <b>-1</b> <b>+5</b>
a) Ringförmiger elementarer Schwefel (Cyclooctaschwefel) ( $S_8$ ) <b>0</b>	Sulfat <b>+6</b>

Abbildung 1.1: Überblick über die Oxidationszahlen (rot unterlegt) und Strukturformeln (gelb unterlegt) der einzelnen, in diesem Text erwähnten Schwefelverbindungen.

Der gesamte Weg der Schwefeloxidation innerhalb von *A. vinosum* ist sehr komplex und wird dreifach unterteilt. Diese Unterteilung bezieht sich auf das jeweilige Zwischen- bzw. Endprodukt der Schwefeloxidation.

- A. Oxidation von Sulfid ( $S^{2-}$ ) zu elementarem Schwefel ( $S^0$ ), der innerhalb der Zelle in Form von Schwefelkugeln gespeichert wird.
- B. Oxidation von elementarem Schwefel ( $S^0$ ) zu Sulfit ( $SO_3^{2-}$ ).
- C. Oxidation von Sulfit ( $SO_3^{2-}$ ) zu Sulfat ( $SO_4^{2-}$ ).

#### 1.4.1 A. Oxidation von Sulfid ( $S^{2-}$ ) zu elementarem Schwefel ( $S^0$ ), der innerhalb der Zelle gespeichert wird

Ursprünglich wurden mehrere Enzyme in Erwägung gezogen, die für die Oxidation des Sulfids zu elementarem Schwefel im Schwefelpurpurbakterium *A. vinosum* in Frage kommen

könnten. Bei diesen Enzymen handelt es sich um die Siroamid-Sulfitreduktase (auch: Sulfitreduktase), Flavocytochrom c (Sulfid:Cytochrom c Oxidoreduktase) und die Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase (SQR).

Bezüglich der Siroamid-Sulfitreduktase wurde vermutet, dass über sie ein Teil des Sulfids direkt zu Sulfit oxidiert wird (Dahl, 2000). Mutanten, denen die Sulfitreduktase fehlte, oxidierten Sulfid jedoch mit der gleichen Rate wie der Wildtyp (Pott und Dahl, 1998). Schwefel ist ein obligates Intermediat bei der Oxidation von Sulfid. Bei dem periplasmatisch lokalisierten Flavocytochrom c entkräften gleich zwei Punkte die Wahrscheinlichkeit für die Beteiligung an der Oxidation. Das ist zum einen die Interposonmutagenese des *fccA*-Gens für die Häm Untereinheit des Proteins, die zeigte, dass es in *A. vinosum* nicht essentiell ist (Pott und Dahl 1998, Reinartz et al., 1998). Zum anderen ist Flavocytochrom c nicht bei allen Sulfid oxidierenden Bakterien zu finden (Dahl et al., 2002).

Am Wahrscheinlichsten ist es, dass in *A. vinosum* die Oxidation von Sulfid ( $S^{2-}$ ) zu elementarem Schwefel durch eine Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase (SQR) katalysiert wird, die membrangebunden ist. Diese Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase (SQR) überträgt, die bei der Oxidation von Sulfid freiwerdenden Elektronen direkt auf Chinon. Dabei wird das Sulfid nicht direkt zu Schwefel oxidiert, sondern es werden intermediär Polysulfide gebildet (Dahl, 2000).

Auch Thiosulfat kann von *A. vinosum* als Elektronendonator verwendet werden. Das Thiosulfat wird in Sulfon- und Sulfanschwefel gespalten. Der Sulfanschwefel wird zunächst einmal nicht weiteroxidiert, sondern in Schwefelkugeln (siehe Kapitel 1.4.2) gespeichert. Der Sulfonschwefel allerdings wird sofort zu Sulfat umgesetzt (Schedel und Trüper, 1980). Die *sox*-Gene, die für einen Multienzymkomplex kodieren, ermöglichen in *A. vinosum* sowie in *Paracoccus pantotrophus* die Thiosulfatoxidation (Friedrich et al., 2001; Hensen et al., 2006).

## 1.4.2 Schwefelkugeln mit gespeichertem Schwefel der Oxidationsstufe 0

Der nach der Oxidation von Sulfid entstandene elementare Schwefel der Oxidationsstufe 0 wird bei den Familien *Ectothiorhodospiraceae* und *Chlorobiaceae* extrazellulär und bei der Familie *Chromatiaceae*, den Gattungen *Beggiatoa*, *Thioploca* und einigen anderen Gattungen intrazellulär in Form von Schwefelkugeln gespeichert (Dahl et al., 2002). Die Schwefelkugeln von *A. vinosum* werden von einer Schicht umgeben, die 2,5 nm dick ist und aus hydrophoben Proteinen besteht. Diese Proteinhülle wird aus den beiden 10,5 kDa schweren homologen

Proteinen SgpA und SgpB und dem kleineren 8,5 kDa schweren Protein SgpC gebildet. Die Entdeckung, dass diese 3 Proteine mit typischen Signalpeptidsequenzen synthetisiert werden, ließ darauf schließen, dass sie über die Cytoplasmamembran transportiert werden. Als Folge dessen wird der Schwefel mit großer Wahrscheinlichkeit extracytoplasmatisch innerhalb der vesikulären Chromatophoren gespeichert. Das Innere dieser Chromatophoren entspricht dem Periplasma (Pattaragulwanit et al., 1998). Ein wesentlicher Aspekt bezieht sich auf die Frage in welcher Form der Schwefel gespeichert wird. Viele verschiedene Techniken bei denen der Schwefel aus den Zellen vor der Analyse extrahiert wurde, hatten zur Folge, dass der Schwefel in seiner Struktur verändert wurde (Trüper und Hathaway, 1967; Hageage et al., 1970; Steudel et al., 1990).

Es wird schon länger vermutet, dass der in den Schwefelkugeln befindliche Schwefel nicht in Form von S<sub>8</sub>-Ringschwefel vorliegt. S<sub>8</sub>-Ringschwefel ist die stabilste Form des Elementarschwefels. Er liegt bei Raumtemperatur und normalem Druck als kristalline Festsubstanz vor (Steudel, 1996). Der Schwefel in den Schwefelkugeln liegt jedoch in einem flüssigen metastabilen Zustand vor (Hageage et al., 1970). XANES (X-Ray Absorption Near Edge Spectroscopy) Spektren intakter schwefelhaltiger Zellen zeigen eine deutliche Ähnlichkeit zu Spektren, die für Bis-Organylsulfane (R-S<sub>n</sub>-R mit n>4) erhalten werden (Prange et al., 1999). Neuere Untersuchungen zeigten, dass der Schwefel in *A. vinosum* zu 80% aus längeren Schwefelketten besteht, die restlichen 20% bestehen aus organischem Polysulfan mit der Struktur C-S-H/C-S-S-C (Prange et al., 2004).

Weiterhin scheint der direkte Kontakt zwischen Schwefel und Zelle notwendig zu sein, um den elementaren Schwefel durch *A. vinosum* aufzunehmen (Franz et al., 2007). Natürlicher Schwefel enthält ringförmige S<sub>8</sub>-Moleküle. Neuere Untersuchungen zeigen, dass *A. vinosum* nur polymere Schwefel (Schwefelketten) nutzt. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist *A. vinosum* nicht in der Lage Cyclooctaschwefel (S<sub>8</sub>) aufzunehmen und daraus Schwefelkugeln zu bilden (Franz et al., 2007).

### 1.4.3 B. Oxidation von elementarem Schwefel ( $S^0$ ) zu Sulfit ( $SO_3^{2-}$ )

Von allen drei Schritten der Schwefeloxidation ist der Schritt der Oxidation von elementarem Schwefel ( $S^0$ ) zu Sulfit ( $SO_3^{2-}$ ), der Schritt über den bisher am wenigsten bekannt ist.

Als essentiell für die Oxidation von elementarem Schwefel zu Sulfit in *A. vinosum* konnte die reverse Sulfitreduktase, kodiert von den beiden Genen *dsrA* und *dsrB*, identifiziert werden. Nach ihrer Aufreinigung in *A. vinosum* wurde zunächst postuliert, dass sie Sulfid zu Sulfit oxidiert. Anlass zu dieser Vermutung gaben Sirohäm-Sulfitreduktasen, die ursprünglich aus Sulfatreduzierern bekannt waren und Sulfit zu Sulfid reduzieren. Man schloss damit auf die Möglichkeit einer „reversen“ Sirohäm Sulfitreduktase in *A. vinosum*, die die direkte Oxidation von externem Sulfid zu Sulfit katalysieren würde (Schedel et al., 1979; Trüper, 1984). Interposonmutagenesen, die die reverse Sulfitreduktase ausschalteten, konnten diese Vermutung ausschließen, da es in Folge der Mutation zu einer Akkumulation von Schwefelkugeln kam. Lediglich der Oxidationsweg von Schwefel zu Sulfit war unterbrochen (Pott und Dahl, 1998). Dies deutet auf eine essentielle Funktion der reversen Sulfitreduktase bei der Oxidation von Schwefel zu Sulfit hin (Pott und Dahl, 1998; Pott-Sperling, 2000). Da sich die reverse Sulfitreduktase jedoch im Cytoplasma befindet (Hipp et al., 1997), steht die Frage offen wie der Schwefel, der periplasmatisch gelagert wird, ins Cytoplasma transportiert wird.

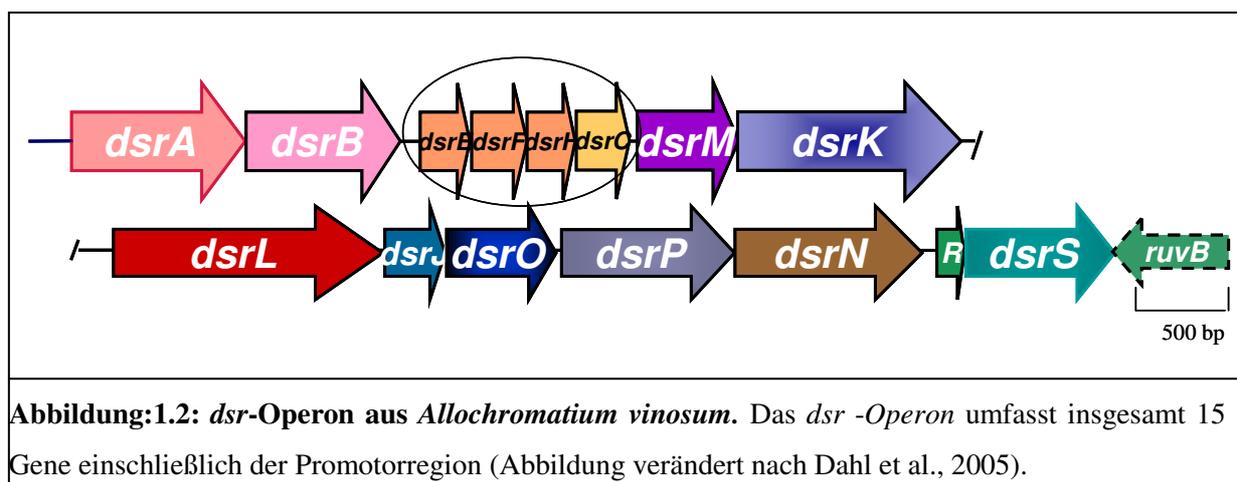
### 1.4.4 C. Oxidation von Sulfit ( $SO_3^{2-}$ ) zu Sulfat ( $SO_4^{2-}$ )

Die Bildung von Sulfat aus Sulfit wird relativ gut verstanden. Für die Oxidation von Sulfit zu Sulfat kommen zwei verschiedene Wege in Frage. Sie kann zum einen über den Adenosin-5'-Phosphosulfatreduktase Weg stattfinden. Das Enzym Adenosin-5'-Phosphosulfatreduktase katalysiert die Bildung von Adenin-5'-Phosphosulfat (APS) durch Oxidation von Sulfit unter Kondensation mit AMP. Sulfit wird dabei oxidiert und es entsteht als Zwischenprodukt APS. Dieser Weg ist jedoch nicht essentiell. Die Grundlagen für diese Aussage lieferten Untersuchungen mit APS-Reduktase defizienten Mutanten. Es zeigte sich dabei, dass die APS-Reduktase defizienten Mutanten, das Sulfit in Raten oxidieren, die mit dem Wildtyp vergleichbar sind (Dahl, 1996). Der zweite mögliche Weg, aber auch der wahrscheinlichere und bevorzugte Weg läuft über die Sulfit-Akzeptor-Oxidoreduktase (SOR). Diese Sulfit-Akzeptor-Oxidoreduktase ist wahrscheinlich ein Molybdoenzym, welches Sulfit, AMP unabhängig, sofort zu Sulfat umsetzt (Dahl, 1996; Sanchez et al., 2001).

## 1.5 Das *dsr*-Operon

Die dissimilatorische Sulfitreduktase ist das erste Enzym, welches mit der Schwefeloxidation in Zusammenhang gebracht wurde (Schedel et al., 1979; Trüper, 1984). Die Gene *dsrA* und *dsrB*, die für die dissimilatorische Sulfitreduktase kodieren, sind die beiden ersten Gene des *dsr* (dissimilatorische Sulfitreduktase) Operons. Durch Sequenzierung der DNA-Regionen, die an die dissimilatorische Sulfitreduktase anschließen, wurden 13 weitere Gene gefunden, die in ihrer Gesamtheit gemeinsam mit der dissimilatorischen Sulfitreduktase das *dsr*- Operon bilden (Dahl et al., 2005).

Das in Abbildung 1.2 dargestellte *dsr* (dissimilatorische Sulfitreduktase)-Operon umfasst 14467 bp, einschließlich der mutmaßlichen Promotorregion, die stromaufwärts des *dsrA*-Gens liegt (Pott und Dahl, 1998; Dahl et al., 2005).



Im folgenden Abschnitt wird jedes Protein, welches vom *dsr*-Operon kodiert wird, kurz vorgestellt.

*dsrA* und *dsrB* kodieren wie schon oben erwähnt für die beiden Untereinheiten der cytoplasmatisch lokalisierten dissimilatorischen Sulfitreduktase (siehe Abbildung 1.2). Die prosthetische Gruppe der dissimilatorischen Sulfitreduktase wurde als Siroamid identifiziert, eine amidierter Form des klassischen Sirohäm (Lübbe et al., 2006). Für den Sulfatreduzierer *Desulfovibrio vulgaris* wurde gezeigt, dass die DsrAB Untereinheiten an DsrC gebunden sind. Der  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  Komplex enthält weiterhin zwei Sirohäm Cofaktoren- [4Fe4S], die von DsrB gebunden werden. DsrA bindet zwei Sirohydrochlorine und zwei [4Fe4S] Zentren, weitere

vier [4Fe4S] Zentren liegen in den Ferredoxin Domänen (Oliveira et al., 2008). Beim Sulfat reduzierenden Archaeon, *Archaeoglobus fulgidus* setzt sich die dissimilatorische Sulfitreduktase aus einem Komplex zusammen, der einem Heterotetramer der Form  $(\alpha\beta)_2$  entspricht, bestehend aus zwei katalytisch unabhängigen  $\alpha\beta$  Heterodimeren. Die dissimilatorische Sulfitreduktase beherbergt je zwei Sirohäm [4Fe4S] Zentren innerhalb eines jeden  $\alpha\beta$  Heterodimers. Jeweils nur ein Sirohäm [4Fe4S] Zentrum innerhalb von jedem  $\alpha\beta$  Heterodimer ist katalytisch aktiv. Der Zugang zum zweiten Zentrum wird durch einen Tryptophanrest blockiert (Schiffer et al., 2008).

DsrN ist ein cytoplasmatisch lokalisiertes Protein von ca. 50 kDa (Lübbe et al., 2006). Das Protein weist Homologie zu einer Cobyriensäure-a,c-Diamidsynthese auf.

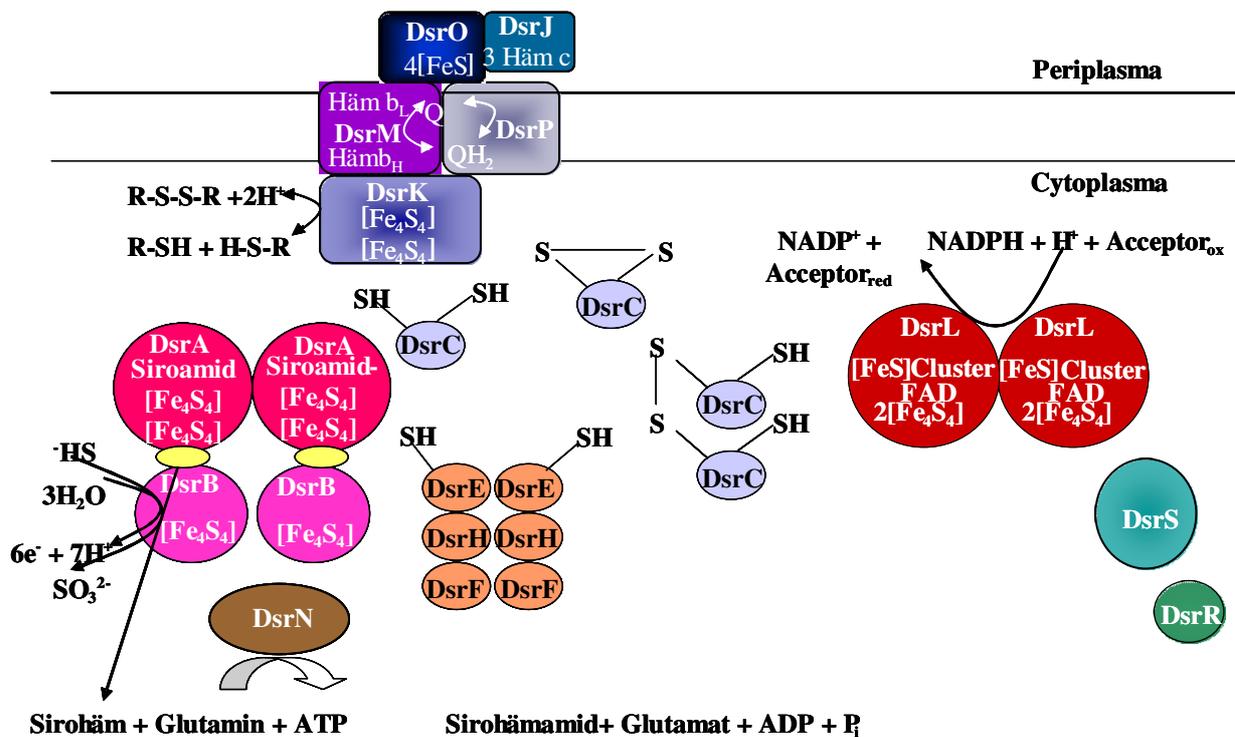


Abbildung 1.3: Übersicht der Proteine des *dsr* Operons. Dargestellt ist die mögliche Lokalisation der vom *dsr*-Operon kodierten Proteine im Cyto- und Periplasma [Abbildung verändert nach (Dahl et al., 2005)].

Letztere ist in die Vitamin B<sub>12</sub>-Biosynthese involviert und katalysiert die ATP-abhängige Amidierung von Cobyriensäure zu Cobyriensäure-a,c-Diamid. Bei dieser Amidierung werden

zwei Moleküle Glutamin zu zwei Molekülen Glutamat umgesetzt (Debussche et al., 1990; Scott und Roessner, 2002). In Sulfatreduzierern wurde bereits seit längerem vermutet, dass Proteine, die dem DsrN homolog sind, eine Rolle bei der Amidierung des Sirohäms spielen (Larsen et al., 2000). Die Vermutung, dass DsrN in *A. vinosum* eine Sirohäm-Amidase ist, die die Glutamin abhängige Amidierung von Sirohäm katalysiert, wurde bestätigt (Lübbe et al., 2006).

Das cytoplasmatische Protein DsrL ist ein Homodimer. Es ist homolog zu der kleinen Untereinheit ( $\beta$ -Untereinheit) der Glutamatsynthasen. Glutamatsynthasen bestehen üblicherweise aus zwei Untereinheiten einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ - Untereinheit. In der  $\alpha$ -Untereinheit, die größer ist, befindet sich die Glutamin-Aminotransferase-Domäne. In der  $\beta$ -Untereinheit befinden sich FAD, [FeS]-Cluster sowie eine NADP(H) Bindestelle. Für das Protein GltA aus *Thermococcus kodakarensis*, das wie DsrL von *A. vinosum* starke Homologien zu der  $\beta$ -Untereinheit der Glutamatsynthasen aufweist, konnte eine Glutamatsynthaseaktivität nachgewiesen werden (Jongsareejit et al., 1997). Die Vermutung lag nahe, dass DsrL ebenso eine Glutamatsynthaseaktivität besitzen könnte, dies wurde jedoch beim rekombinanten DsrL nicht bestätigt (Lübbe et al., 2006). Ebenso ist das Gen, welches für *dsrL* kodiert, nicht in der Lage einen *E. coli* Stamm zu komplementieren, dem die Glutamat-Synthase fehlt (Lübbe et al., 2006). Andererseits zeigte sich nach der Deletion von *dsrL*, dass das von ihm kodierte Protein essentiell für die Schwefeloxidation ist (Lübbe et al., 2006). Unter den Proteinen mit denen DsrL auch in Zusammenhang gebracht wird, ist *SudA*, die große  $\alpha$ -Untereinheit der Sulfid-Dehydrogenase (*SudAB*) von *Pyrococcus furiosus* (Hagen et al., 2000). Sie katalysiert die Reduktion von Polysulfid zu  $H_2S$  und hat ebenso die Funktion einer Ferredoxin: NADP<sup>+</sup>-Oxidoreductase. Phylogenetische Untersuchungen zeigten jedoch, dass *dsrL* nicht in ein und dasselbe Cluster mit den *sudA* homologen Sequenzen fällt (Andersson und Roger, 2002). Möglicherweise ist DsrL an einem Elektronentransfer zwischen NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H + H<sup>+</sup> und einem Akzeptor oder Donor beteiligt. Entsprechend würden die Sulfitreduktase und/oder DsrK als Elektronenakzeptor bzw. Elektronendonator in Frage kommen (Dahl et al., 2005).

Wie in Abbildung 1.3 gezeigt, bilden die fünf Proteine DsrM, DsrK, DsrJ, DsrO und DsrP einen Membran durchspannenden Komplex. Man vermutet, dass dieser Komplex Elektronen von cytoplasmatischen Proteinen aufnimmt oder an sie abgibt. DsrM ist wahrscheinlich ein Membran-gebundenes *b*-Typ Cytochrom (Dahl et al., 2005). Es beinhaltet mehrere

konservierte Histidinreste, und fünf Transmembranhelices sind wahrscheinlich. Der N-Terminus liegt mit großer Wahrscheinlichkeit im Periplasma (Pott und Dahl, 1998).

DsrK, welches zwei N-terminal gelegene [4Fe4S]-Cluster Bindestellen enthält, wird möglicherweise auf der cytoplasmatischen Seite mit dem Komplex assoziiert sein (Pott und Dahl, 1998). DsrK besitzt maßgebliche Ähnlichkeit zu Heterodisulfidreduktasen von methanogenen Archaeen genau wie DsrM.

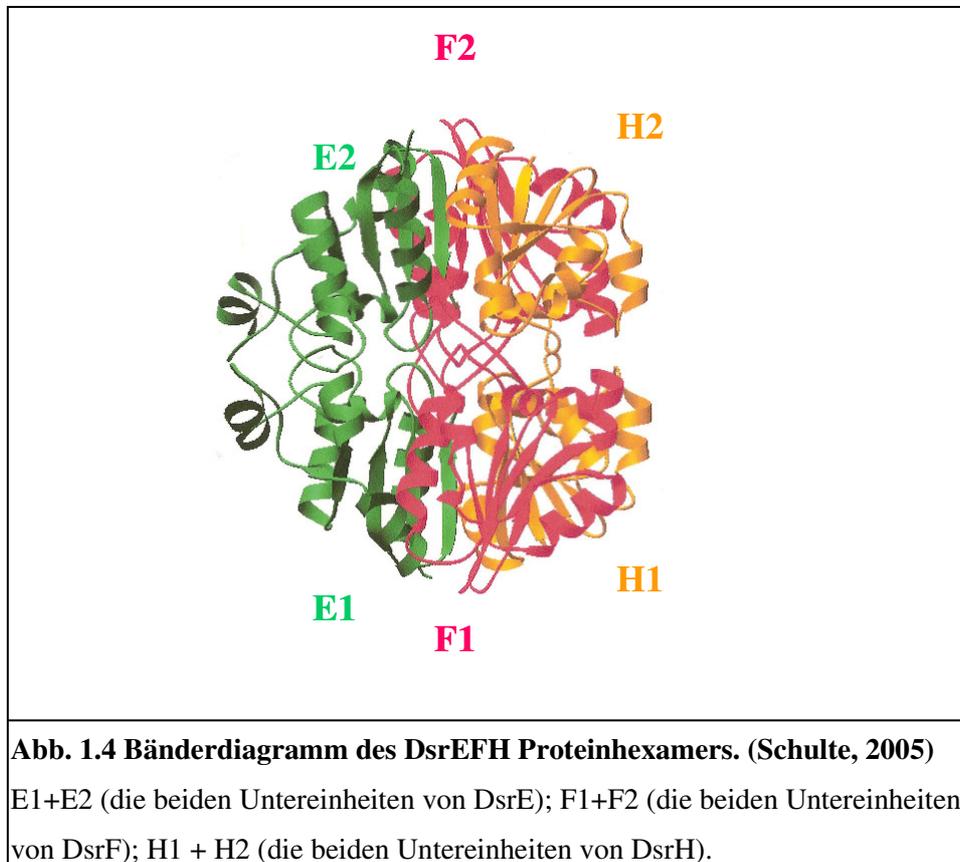
Das DsrJ Protein ist wahrscheinlich ein Trihäm Cytochrom c. Es besitzt ein typisches Sec abhängiges Signalpeptid (Dahl et al., 2005). Mit Hilfe des Signalpeptids vermittelt es einen Transport durch die Cytoplasmamembran (Fekkes und Driessen, 1999). Auch DsrO hat ein mutmaßliches [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>] Cluster (Dahl et al., 2005). Es hat ein Tat-Signalpeptid und wird mit Hilfe des Tat-Systems zum Periplasma transportiert. Tat-Signalpeptide ermöglichen den Transport von gefalteten Proteinen über Membranen (Berks, 1996; Berks et al., 2000). Das letzte Protein innerhalb des Membrankomplexes DsrP besitzt wahrscheinlich 10 Transmembranhelices. Keines der Histidinreste ist innerhalb der mutmaßlichen Transmembranhelix lokalisiert, deshalb geht man davon aus, dass es keine Häm-Gruppen binden kann (Dahl et al., 2005). In „frame“ Deletionsmutagenese zeigte, dass jedes Protein aus dem DsrMKJOP Komplex uneingeschränkt erforderlich ist für die Oxidation gespeicherten Schwefels in *A. vinosum* (Sander et al., 2006). Die Wichtigkeit des DsrMKJOP Komplexes wird durch die Tatsache unterstrichen, dass die betreffenden Gene in allen bisherigen sequenzierten Genomen Schwefel bildender Bakterien vorkommen wie z.B. *Thiobacillus denitrificans* und *Chlorobaculum tepidum* (Sander et al., 2006).

Über die beiden kleinen Proteine DsrR und DsrS ist am wenigsten bekannt. Die beiden Gene *dsrR* und *dsrS*, die für diese Proteine kodieren, bilden sozusagen den Abschluss des *dsr*-Operons. DsrR ist verwandt mit IscA und der HesB Domäne aus *E.coli*, die wahrscheinlich beide in der Eisen-Schwefel Cluster Bildung involviert sind (Cupp-Vickery et al., 2004). Die beiden carboxyterminalen Cysteinreste, die in der IscA-HesB Domäne konserviert sind, fehlen in DsrR (Dahl et al., 2005). *dsrS* homologe Gene wurden in dem chemotrophen Schwefeloxidierer *Thiobacillus denitrificans* gefunden (Dahl et al., 2005). Auch in *Beggiatoa* und z.B. *Vesicomysocius okutanii* wurden *dsrR* homologe Gene gefunden. Zwei Argumente sprechen für das Ende des *dsr*-Operons. Im Anschluss an das *dsrS* Gen befindet sich eine palindromische Sequenz, die als Terminator in Frage kommen könnte. Die für rho-abhängige Terminatoren typische Poly-T-Sequenz (Reynolds et al., 1992) fehlt diesem Terminator jedoch. Weiterhin deutet das stromabwärts auf dem Gegenstrang kodierte *ruv-B* Gen das Ende

des *dsr*-Operons an (Dahl et al., 2005). Mit Hilfe von Interposonmutagenesen bezüglich *dsrS* und *dsrR*, konnte eine Beteiligung an der Schwefeloxidation nachgewiesen werden (Dahl et al., 2005).

Die kleinen Gene *dsrE*, *dsrF* und *dsrH* kodieren für die drei cytoplasmatischen Cofaktorfreien Polypeptide DsrE, DsrF und DsrH. Die Bestimmung der Kristallstruktur, die mittels Röntgenkristallographie ermittelt wurde, zeigte, dass die drei Polypeptide ein Heterohexamer (siehe Abbildung 1.4) mit der Struktur  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  bilden (Dahl et al., 2007). DsrE, DsrF und DsrH liegen innerhalb des Heterohexamers in einem Verhältnis von 1:1:1 vor (Schulte, 2005; Dahl et al., 2005). Die apparente molekulare Masse des DsrEFH Proteinkomplexes beträgt 83 kDa (Schulte, 2005). DsrE, DsrF und DsrH werden zusammen mit DsrAB, DsrC und Proteinen des Membran durchspannenden Komplexes DsrMKJOP aufgereinigt (Dahl et al., 2005).

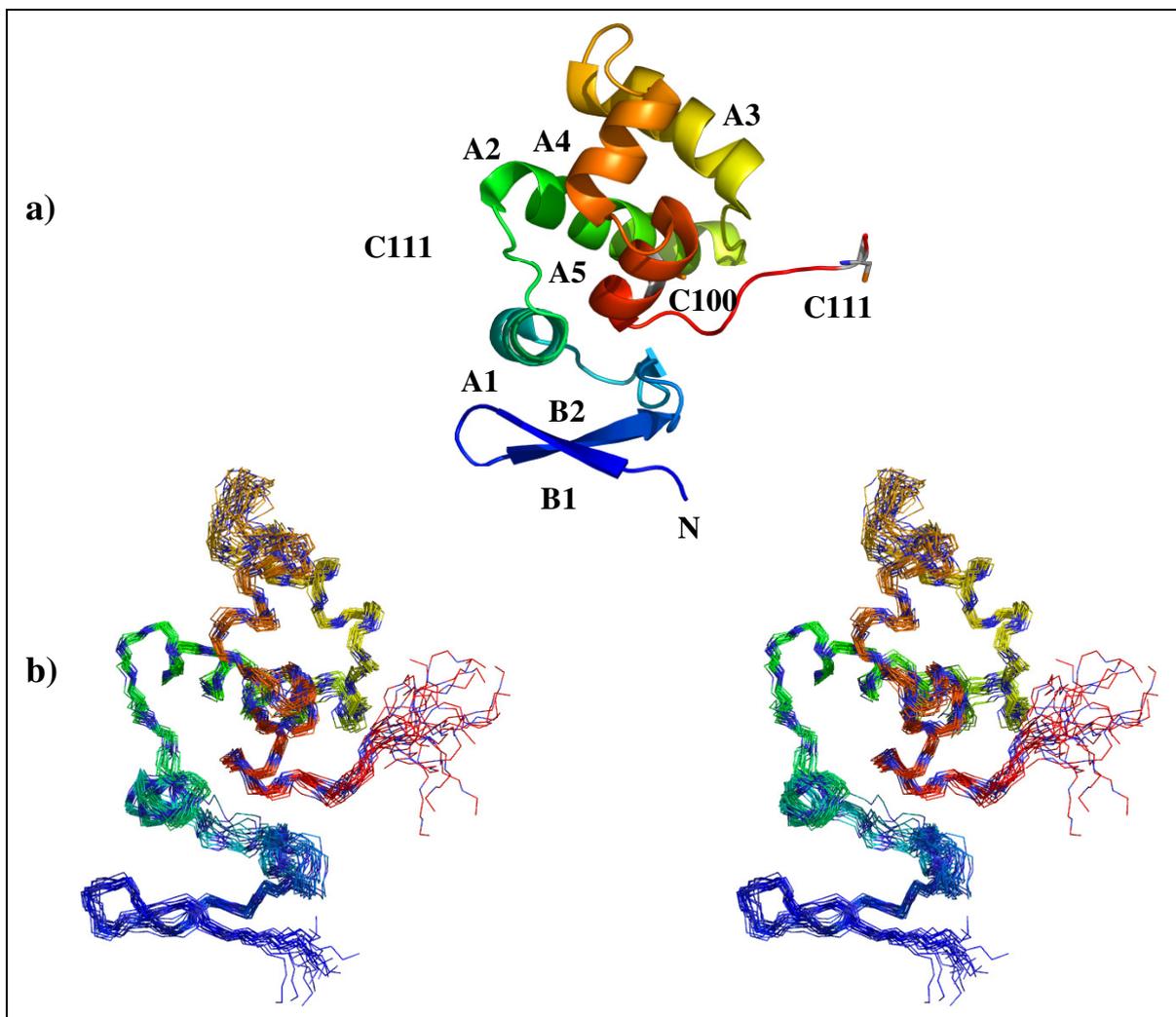
Die Gene *dsrEFH* sind spezifisch für Schwefel oxidierende Bakterien wie z.B. *Thiobacillus denitrificans*, *Chlorobaculum tepidum* und andere, die auch die Proteine DsrAB exprimieren. Zu DsrEFH homologe Proteine wurden in Bakterien gefunden, denen DsrAB fehlt. Dazu gehört, neben einigen anderen Gammaproteobakterien, auch *Escherichia coli*. Dabei zeigen Sequenzvergleiche, dass die drei Polypeptide DsrE, DsrF und DsrH aus *Allochromatium*



*vinosum*, Homologien zu den Proteinen TusB (ehemals YheL), TusC (ehemals YheM) und TusD (ehemals YheN) aus *Escherichia coli* haben (Pott und Dahl, 1998; Ikeuchi et al., 2006). Die Gene *dsrEFH* treten in Sulfat reduzierenden Bakterien nicht auf (Mussmann et al., 2005; Sander et al 2006; Grimm et al., 2008). Wenn man jedes der drei Proteine einzeln betrachtet, so betragen die durch ESI-MS-Analyse ermittelten Massen für DsrE 14,590 kDa, für DsrF 15,463 kDa und für DsrH 10,954 kDa. DsrE besitzt in Position 78 einen Cysteinrest, der hoch konserviert ist. In Position 20 hat auch DsrH einen hoch konservierten Cysteinrest. In der *dsrF* kodierenden Region ist ein weiterer konstitutiver Promotor lokalisiert. Von ihm aus werden die Gene *dsrH* und *dsrC* transkribiert (Pott und Dahl, 1998). Auf diesen Promotor ist es wahrscheinlich zurückzuführen, dass eine *A. vinosum* Mutante, der die Gene *dsrE*, *dsrF* und *dsrH* fehlen, genetisch instabil ist. Weiterhin wurde für DsrF eine Rhodaneseaktivität postuliert (Schwarz, 2001), einen für eine Rhodaneseaktivität erforderlichen Cysteinrest, der konserviert ist, besitzt DsrF jedoch nicht.

Ebenso Cofaktor-frei und cytoplasmatisch ist das Protein DsrC, welches von *dsrC* kodiert wird. Die Tertiärstruktur des *Allochromatium vinosum* DsrC (siehe Abbildung 1.5) besteht aus einer zwei Strang  $\beta$ -Haarnadel, die am Aminoterminal auftritt. Die fünf folgenden  $\alpha$ -Helices bilden ein orthogonal angrenzendes Bündel. Die konservierten carboxyterminalen Aminosäurereste beenden das Bündel vom Ende der fünften Helix und bilden einen flexiblen Arm (Cort et al., 2008). In *A. vinosum* wurde DsrC zusammen mit dem Heterohexamer DsrEFH und Proteinen des DsrMKJOP Membrankomplexes in Präparationen aus der Membranfraktion gefunden (Dahl et al., 2005). Eine „in frame Deletionmutante“, in der das *dsrC* Gen deletiert wurde, erwies sich als genetisch instabil (Cort et al., 2008). Alle Organismen mit *dsrAB* haben auch das Gen für DsrC. In einigen Fällen innerhalb desselben Operons wie *dsrAB* und anderen *dsr* Genen und in anderen Fällen entfernt von den *dsrAB* Genen (Karkhoff- Schweizer et al., 1993; Frigaard und Dahl, 2009; Loy et al., 2008). Signifikante Homologien des DsrC Proteins finden sich zu den *dsv(r)C*-Genen aus *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk et al., 1997), *Desulfovibrio vulgaris* (Karkhoff-Schweizer et al., 1993), *Pyrobaculum islandicum* (Molitor et al., 1998), *P. aerophilum* (Cort et al., 2001) und zu Genprodukten aus *H. influenza* (Fleischmann et al., 1995). In *E. coli* findet sich das DsrC Homologe TusE (Ikeuchi et al., 2006). Die C-Termini, dieser zum DsrC Protein aus *A. vinosum* homologen Sequenzen, zeigen große Übereinstimmungen. Sie haben jeweils einen hoch konservierten Cysteinrest am C-Terminus, dieser befindet sich in der vorletzten Position des C-Terminus (Pott und Dahl, 1998; Pott-Sperling, 2000). DsrC Sequenzen von

Organismen, die auch das DsrAB Protein enthalten, haben ein zusätzlich konserviertes Cystein am C-Terminus. Dieses zusätzliche Cystein fehlt Organismen, die kein DsrAB enthalten (Cort et al., 2008). Die *dsv(r)* Genprodukte wurden bei einigen Sulfatreduzierern zusammen mit der Sulfitreduktase gereinigt (Arends et al., 1993; Pierik et al., 1992; Steuber et al., 1995). Aufgrund dessen wurde eine Funktion als dritte Untereinheit der dissimilatorischen Sulfitreduktasen postuliert (Pierik et al., 1992; Steuber et al., 1995). DsrC kann zwei Konformationszustände einnehmen, wenn es unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgereinigt wird. Bei diesen Konformationszuständen handelt es sich um ein Monomer mit einer Größe von 14,6 kDa und ein Dimer mit einer Größe von 29,2 kDa (Schulte, 2005).



**Abb. 1.5:** Tertiärstruktur des *Allochromatium vinosum* DsrC (Cort et al., 2008).

**a)** Bänderzeichnung des *Allochromatium vinosum* DsrC. Der Aminoterminus ist blau markiert und der C-Terminus rot unterlegt. A1-A4:  $\alpha$ -Helices, B1-B2:  $\beta$  Stränge. **b)** Stereosicht des *Allochromatium vinosum* DsrC.

## 1.6 Cystein

Die Aminosäure Cystein enthält Schwefel innerhalb ihrer Sulfhydryl (SH)-Gruppe. Unter physiologischen Bedingungen ermöglichen die Redoxeigenschaften des Cysteins eine erstaunliche Vielfalt posttranslationaler Proteinmodifikationen, metallfreier Redoxreaktionen und ungewöhnliche Chalkogenredoxzustände. Wie keine andere Aminosäure kann das „Redoxchamäleon“ Cystein an so unterschiedlichen Redoxreaktionen wie Atom-, Elektronen- und Hybridtransfer sowie Radikal und Austauschreaktionen beteiligt sein (Jacob et al., 2003). Bei kovalenten Bindungen können Cysteine folgende Rolle spielen:

Bei der Faltung der Aminosäurekette spielt ein Typ der kovalenten Bindung eine Rolle. Es ist die Disulfidbindung. Die SH-Gruppe in der Seitenkette von Cystein geht bevorzugt Reaktionen mit der SH-Gruppe eines weiteren Cysteins ein. Es bilden sich Disulfid-Brücken (S-S). Disulfidbrücken spielen eine wichtige Rolle für die Proteinstruktur und deren Stabilität. Ohne Disulfidbrücken sind viele Proteine nicht funktionsfähig (Bardwell, 2004). Disulfidbrücken können sowohl Bereiche innerhalb desselben Proteins als auch von verschiedenen Polypeptiden kovalent miteinander verbinden. Während intrazelluläre Proteine aufgrund des niedrigen Redoxpotentials in der Zelle meist wenige Disulfidbrücken aufweisen, enthalten extrazelluläre Proteine meist viele Disulfidbrücken, welche die korrekt gefaltete Struktur überhaupt erst ermöglichen.

## 1.7 Zielsetzung

DsrC und DsrEFH stellen kleine Proteine im *dsr*-Operon des Schwefelpurpurbakterium *Allochromatium vinosum* dar. Sowohl DsrC als auch DsrEFH sind cytoplasmatische und Cofaktor-freie Proteine. DsrC besitzt am C-Terminus zwei hochkonservierte Cysteine Cys100 und Cys111. Die Proteine DsrE, DsrF und DsrH liegen als Heterohexamer in der Form  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  vor (Dahl et al., 2005). Die Funktionen von DsrC und DsrEFH innerhalb des Schwefelstoffwechsels sind unbekannt.

Ausgehend von den ersten erfolgreichen Versuchen, die Proteine DsrC und DsrEFH aus *Allochromatium vinosum* aufzureinigen (Pott-Sperling, 2000; Schulte, 2005), stehen im Mittelpunkt dieser Arbeit Untersuchungen zur Dimerbildung des DsrC Proteins sowie Untersuchungen zu seiner möglichen Interaktion mit dem Proteinheterohexamer DsrEFH. Cysteine sind bekanntlich häufig für die Dimerbildung essentiell, und somit war es nahe-

liegend die Bedeutung der beiden hochkonservierten Cysteinreste Cys100 und Cys111 für die Dimerisierung zu untersuchen. Als Grundlage für alle Experimente wurden Mutanten des *dsrC* Gens in den kommerziellen pET15b Vektor inkloniert. Mit Hilfe dieser Mutanten sollte dann geklärt werden, welche Cysteine an der Dimerbildung beteiligt sind.

Des Weiteren sollten eingehende Untersuchungen mit Hilfe der hergestellten Mutanten klären, welche Rolle die beiden hochkonservierten Cysteine Cys100 und Cys111 des DsrC Proteins bei der Interaktion mit dem Proteinheterohexamer DsrEFH spielen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firmen Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) verwendet.

#### 2.1.2 DNA- und Protein-Marker

100 bp DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
1000 bp DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)

#### 2.1.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase Gibco (Invitrogen, Karlsruhe);

T4 DNA-Ligase, *Pfu*-Polymerase, *Tag*-Polymerase, *Bam*HI, *Nde*I, *Xho*I, *Sca*I, *Pvu*I Fermentas (St. Leon-Rot).

#### 2.1.4 Nährmedien und Antibiotika

Zur Herstellung der Nährmedien und Puffer wurde, sofern nicht anders beschrieben entmineralisiertes Wasser verwendet.

Die Nährmedien wurden zur Sterilisation 20 min bei 120°C autoklaviert. Agarhaltigen Medien wurde zur Selektion plasmidkodierter Antibiotikaresistenz Ampicillin [100 µg/ml] zugesetzt.

**LB-Medium**                      10 g Pepton , 5 g Hefeextrakt , 5 g NaCl  
ad 1 l A. dest.

**2 x YT-Medium**                      16 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 10 g NaCl  
ad 1 l A. dest.

<b>LB- Agar</b>	10 g Pepton , 5 g Hefeextrakt , 5 g NaCl, 15 g Agar ad 1 l A. dest.
<b>Ampicillin</b>	10 mg Ampicillin /ml A. dest.

Sämtliche Medien und Zusätze wurden von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen.

## 2.1.5 *E. coli*-Stämme

### 2.1.5.1 *E. coli* BL21 (DE3)

Genotyp: *F ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm met* (DE3)

Bezugsquelle: Novagen Merck Biosciences (Darmstadt)

Dieser Stamm wurde zur Überexpression rekombinanter Proteine benutzt.

### 2.1.5.2 *E. coli* DH5α

Genotyp: *F- φ80d lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1*

*hsdR17 (rk- mk+) supE44 λ-thi-1 gyrA relA1*

Referenz: (Hanahan, 1983)

Dieser Stamm diente als Wirtstamm für Plasmide bei der Klonierung.

## 2.1.6 Plasmide

In dieser Arbeit wurden sowohl kommerziell erworbene als auch bereits im Labor vorhandene bzw. selbst hergestellte Plasmide verwendet.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pET15b (Amp <sup>R</sup> )	Expressionsvektor für Fusionsproteine mit N-terminalem His-Tag	Novagen, (Madison)
pETCEX (Amp <sup>R</sup> )	785 bp PCR-Fragment ( <i>dsrc</i> ) nach Restriktion mit <i>NdeI/BamHI</i> in mit <i>NdeI/BamHI</i> restringiertes pET15b kloniert.	(Pott-Sperling, 2000)
pETEFH (Amp <sup>R</sup> )	1800 bp PCR-Fragment( <i>dsrcEFH</i> ) nach Restriktion mit <i>NdeI/XhoI</i> in mit <i>NdeI/XhoI</i> restringiertes pET15b kloniert.	(Schulte, 2005)

**Tabelle 2.1. Kommerziell erwerbbar oder bereits hergestellte Plasmide**

Alle anderen verwendeten Plasmide wurden selbst hergestellt und im Ergebnisteil beschrieben.

Diese im Ergebnisteil beschriebenen Plasmide, wurden zum Zweck NMR spektroskopischer Untersuchungen, Herrn Dr. John Cort, Pacific Northwest National Laboratory, Richland WA (USA) zur Verfügung gestellt.

## 2.1.7 Geräte

Elektrophoresegeräte	Mini Gelkammern Biorad (München)
High Load	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
PCR-Thermocycler	Biometra (Göttingen)
pH-Meter	Analog pH-Meter (Schott)
Photometer	Dioden Array Spectralphotometer (Agilent 845) (Agilent Technologies Deutschland GmbH) Novaspec II Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
	Perkin Elmer
Powersupply	Biometra (Göttingen)
Thermocycler	Biometra (Göttingen)

Zentrifugen	Beckmann Coulter Avanti TMJ 20XP Beckmann Coulter GmbH (Krefeld) Mikrolaborzentrifuge
Ultraschallgerät	Biometra (Göttingen)
Videodokumentation	INTAS (Göttingen)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Anzucht von *E. coli*

##### 2.2.1.1.1 Vorkulturen

*E. coli* Zellen wurden aus einer Glycerin-Stammkultur auf einer LB-Agarplatte (supplementiert mit dem Antibiotikum Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Bakterienflüssigkulturen wurden in 5 ml LB-oder 2 x YT-Medium aus einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm auf dem Inkubationsschüttler inkubiert.

##### 2.2.1.1.2 Hauptkulturen für Plasmidisolierung und Proteingewinnung

Die LB-Hauptkultur wurde 1-2 %ig (v/v) aus der Vorkultur beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 180 rpm in 1000 ml-Nasenkolben mit Schikane zum besseren Sauerstoffeintrag. Das seitlich angesetzte Glasrohr diente zur Verfolgung der optischen Dichte.

##### 2.2.1.2 Zellernte

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei Raumtemperatur und 4000 x g geerntet. Die Ernte erfolgte in 500 ml Zentrifugenbechern mit Schraubverschluss. Es wurde eine Beckmann Zentrifuge Modell (Coulter Avanti) mit einem JA 10 Rotor verwendet. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in ein passendes Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.2.1.3 Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung der kompetenten *E. coli* Zellen wurde die Calciumchlorid-Methode (Dagert und Ehrlich, 1979) verwendet. Dazu wurden zunächst 5 ml 2 x YT-Medium (supplementiert mit dem erforderlichen Antibiotikum Ampicillin) mit einer Kolonie einer Stammpolte angeimpft und über Nacht bei 37°C und unter Schütteln bei 180 rpm inkubiert.

Als Hauptkultur wurden 70 ml 2 x YT-Medium 1 %ig mit der Übernachtskultur angeimpft und auf dem Rotationsschüttler (180 rpm, 37°C) inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,3-0,4 vorlag. Nach Erreichen dieser Zelldichte, wurde die Kulturlösung zunächst für 5 min auf Eis abgekühlt, bevor sie in zwei sterilen Zentrifugenröhrchen in der Sorvall-Zentrifuge bei 2500 x g, 4°C für 6 Minuten abzentrifugiert wurde. In jeweils 10,5 ml eiskalter 70 mM CaCl<sub>2</sub>/20 mM MgSO<sub>4</sub> Lösung erfolgte die Resuspension der pelletierten Bakterien durch vorsichtiges Schütteln. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation bei 2500 x g und 4°C für 10 Minuten. In jeweils 3,5 ml eiskalter 70 mM CaCl<sub>2</sub>/20 mM MgSO<sub>4</sub> Lösung wurde das Bakterienpellet wiederum unter Schütteln resuspendiert. Es erfolgte erneut eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Bevor Aliquots dieser Suspension von je 100 µl in sterile Eppendorfgefäße überführt und bei -70°C gelagert wurden, wurde die Suspension mit 875 µl sterilem Glycerin gemischt.

**Stammlösungen:** 1 M CaCl<sub>2</sub> (steril), 1 M MgSO<sub>4</sub> (steril); zum Herstellen der Lösung :70 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM MgSO<sub>2</sub> werden die 1 M Stammlösungen getrennt autoklaviert.

### 2.2.1.4 Calciumchlorid-Transformation von *E. coli* Zellen

Ein Aliquot (100 µl), der zu transformierenden oder zu testenden Zellen wurde bei 4°C auf Eis aufgetaut. Es wurde mit 1 µl des zu transformierenden Vektors versetzt oder alternativ der gesamte Ligationsansatz (30 µl) hinzugegeben. Nach vorsichtigem Umrühren, wurde der Ansatz zuerst 30 Minuten auf Eis, dann für 90 Sekunden bei 42°C im Heizblock inkubiert. Um das Präparat abzukühlen, erfolgte nach dem Hitzeschock eine 2 minütige Inkubation auf Eis. Nach der Zugabe von 500 µl 2 x YT-Medium folgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37°C. 100 bzw. 200 µl des Transformationsansatzes, wurden auf je eine LB-Platte, supplementiert mit dem Antibiotikum Ampicillin, ausplattiert. Der Rest des Transformationsansatzes wurde 10 Sekunden bei 9000 x g abzentrifugiert. Der Überstand

wurde bis auf 50 µl Medium verworfen. In diesen 50 µl, wurde das Pellet resuspendiert und anschließend auf eine LB+Amp-Platte ausgespatelt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet.

Zur Einleitung weiterer Untersuchungen wurden je 5 ml LB+ Amp-Medium mit je einem Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert.

## 2.2.2 Molekulargenetische Arbeiten

### 2.2.2.1 Isolation der Plamid- DNA aus *E. coli*

Zur Gewinnung der DNA für Klonierungen und Sequenzierungen wurden 5 ml LB-Medium, das zuvor mit dem Antibiotikum Ampicillin supplementiert wurde, mit Bakterienmaterial angeimpft. Der Ansatz wurde daraufhin bei 37°C im Inkubationsschüttler inkubiert, bis eine optische Dichte OD<sub>600</sub> von ≈ 0,8-1 erreicht war. Mit Hilfe des *Qiaprep-spin-Plasmid Kit* der Firma Qiagen (Hilden) erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA gemäß den Vorschriften des Herstellers.

### 2.2.2.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Im Anschluss an die Präparation erfolgte eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle. Ein Teil der Plasmidlösung wurde im Diodenarray bei 260 und 280 nm vermessen. Der gemessene Wert wird mit der Konstante (c) und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Bei einer Extinktion von 1, mit 1 cm Schichtdicke der Quarzküvette, hatte eine dsDNA-Lösung (z.B. Plasmide) die Konzentration 50 µg/ml, eine ssDNA-Lösung (z.B. Primer) eine Konzentration von 33 µg/ml. Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm  $Abs_{260}/Abs_{280}$  hat bei reiner DNA einen Wert zwischen 1,8-2,0 (Sambrook et al., 1989). RNA-Beimengungen führen zu einem niedrigeren und Proteinverunreinigungen zu einem höheren Wert. Es wurden ausschließlich reine DNA Lösungen weiter verwendet.

$$OD_{260} \times c \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Konzentration } (\mu\text{g/ml})$$

$$\text{Doppelstrang DNA} \quad c = 50 \mu\text{g/ml}$$

### 2.2.2.3 Agarose –Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in einer horizontalen Mini Gelkammer der Firma Biorad (München). Die Elektrophoresen wurden in 1 x TAE-Puffern durchgeführt. Die mit TAE-Puffer hergestellten Gele, hatten eine Agarosekonzentration von 1 % (w/v). Bevor die DNA -Proben in die Taschen pipettiert wurden, wurden sie mit 1/10 Volumen 10 x DNA-Beschwererlösung versetzt. Zur Größenabschätzung wurden je 5 µl einer 1 kb-Leiter bzw. einer 100 bp Leiter auf die Gele aufgetragen. In den Gelkammern wurde die Elektrophorese bei konstanter Spannung (100 Volt), ca. ein bis zwei Stunden durchgeführt. Nach Abschluss der Elektrophorese, wurde das Gel 20 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) im Dunkeln auf einem Schüttler gefärbt. Um die Bandenschärfe zu verbessern, wurde anschließend durch fünf Minuten langes Wässern überschüssiges Ethidiumbromid entfernt. Die interkalierenden Ethidiumbromid-Moleküle machen aufgrund ihrer fluoreszierenden Eigenschaften die DNA-Helix im UV-Licht ( $\lambda$ -254 nm) sichtbar. Auf einem UV-Tisch mit der Videodokumentationsanlage der Firma INTAS (Göttingen) erfolgte die Dokumentation.

#### **Stammlösungen:**

**50 x TAE Elektrophoresepuffer:** 2 M Tris-Acetat (pH 7,8); konz. Essigsäure, 50 mM EDTA, (pH 7,5). Bei Gebrauch: 1:50 mit Aqua bidest. verdünnt.

**DNA–Beschwererlösung (10 x):** 0,025 % Bromphenolblau, 40 % Saccharose

### 2.2.2.4 Rückgewinnung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente konnten nach der gelelektrophoretischen Auftrennung für weitere Experimente aus den Agarosegelen zurückgewonnen werden. Die betreffenden DNA-Fragmente, wurden mit dem Skalpell ausgeschnitten und mit dem *Qiaquick Gel extraction Kit* der Firma Qiagen (Hilden) aus dem Gel eluiert. Die Verarbeitung erfolgte gemäss dem von Qiagen vorgeschlagenen Protokoll. Alle für diesen Abschnitt verwendeten Chemikalien entstammten dem Kit. Zunächst wurde dabei die Agarose bei 50°C gelöst. Durch Zugabe von chaotropen Salzen, wurde die Affinität der DNA zu der verwendeten Säule erhöht. Auf diese Weise wurde die DNA an die Säule gebunden. Nach dem Waschen und Trocknen, wurde die DNA mit Aqua bidest. eluiert.

### **2.2.2.5 Restriktionsanalyse zur Klonierung und zur Identifizierung gewünschter Klone**

DNA, die mittels Restriktion an definierten Erkennungssequenzen analysiert werden sollte, wurde gemäß den Angaben des Herstellers mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und den zugehörigen Reaktionspuffern gemischt und 2-3 Stunden bei 30°C oder 37°C inkubiert. Für die Restriktion von 1 µg DNA wurde circa eine Einheit Restriktionsenzym eingesetzt. Restringierte DNA, die später für die Klonierung eingesetzt werden sollte, wurde nach der Restriktion 10 Minuten bei 65°C inkubiert, um die Restriktionsenzyme zu inaktivieren. Die weitere Analyse erfolgte mittels der Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kap. 2.2.2.3).

### **2.2.2.6 Ligation mit T4-Ligase**

Ligationen mit T4-DNA-Ligase und Dephosphorylierungen mit alkalischer Phosphatase (CIP) von DNA, erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers. Während der Durchführung gab es Probleme. Die Inkubation des Ligationsansatzes gestaltete sich kritisch. Erst die Verkürzung der Inkubationszeit von 12-20 Stunden auf 1 Stunde und die Änderung der Inkubationstemperatur von 16°C auf Raumtemperatur beeinflusste die Ligierung positiv.

### **2.2.2.7 Sequenzanalyse der DNA**

Alle Sequenzierungsreaktionen wurden als Auftragsarbeit von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

### **2.2.2.8 Amplifikation der DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986) erlaubt die Amplifikation von DNA zwischen zwei flankierenden Regionen mit bekannter DNA-Sequenz. Für die Reaktion werden eine DNA-Matrize (Template), zwei Primer (Oligonukelotide), Didesoxynukleotide (dNTPs), eine hitzestabile DNA-Polymerase und  $Mg^{2+}$  benötigt. Um die DNA in dieser Arbeit zu amplifizieren, wurde das Verfahren der PCR Mutagenese angewandt. Es handelt sich in diesem Fall um die zielgerichtete Mutagenese (Site directed mutagenesis).

### **2.2.2.8.1 Zielgerichtete Mutagenese (site directed mutagenesis)**

Mit der Methode der zielgerichteten Mutagenese (site directed mutagenesis), lassen sich einzelne Basen eines Gens gezielt austauschen, indem Genfragmente fusioniert werden, in die man vorher durch mutagene PCR-Primer Mutationen eingeführt hat (Saiki et al., 1988; Horton et al., 1989).

Zum Austausch einer Base in dem betreffenden Genfragment sind insgesamt vier Oligonukleotide erforderlich. Mit den beiden ersten zwei PCR Reaktionen erzeugt man zunächst zwei überlappende Genfragmente, die den gewünschten Basenaustausch enthalten. Diese beiden Fragmente werden in einer dritten PCR fusioniert.

#### **2.2.2.8.1.1 Oligonukleotide**

Die zur DNA-Amplifikation benutzten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Bebbersberg) synthetisiert und auf eine Konzentration von 100 µmol pro Liter eingestellt.

Die Oligonukleotide wurden daraufhin für die weitere Nutzung auf die entsprechende Konzentration von 10 pmol/µl gelöst.

Die folgende Liste der Oligonukleotide setzt sich aus den beiden äußeren Oligonukleotiden, T7 Promotor Primer und CEXrev, sowie den mutagenen Oligonukleotiden, CEXSer100for, CEXSer100rev, CEXSer111for2 und CEXSer111rev2 zusammen.

Name	Sequenz	Schmelztemperatur $T_m^*$
T7 Promotor Primer	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	53, 2 °C
CEXrev	5'-GTCTTCAAGAATTCTCATGTTT-3'	52, 8 °C
CEXSer100for	5'-AAGCAGGCGT <b>CCCGTTTC</b> -3'	58, 2 °C
CEXSer100rev	5'-GAAACGG <b>G</b> ACGCCTGCTT-3'	58, 2 °C
CEXSer111for2	5'-CCGACCGGCT <b>CCGTCTAGCGGAT</b> -3'	69, 6 °C
CEXSer111rev2	5'-ATCCGCTTAGAC <b>GGAGCCGGTCGG</b> -3'	69, 6 °C

**Tabelle 2.2: Verwendete Oligonukleotide.** Die veränderten Nukleotide der mutagenen Oligonukleotide sind rot markiert. Die Schmelztemperaturen wurden von der Firma MWG Biotech (Bebersberg) beigefügt.

#### 2.2.2.8.1.2 *Pfu*-DNA-Polymerase

Die *Pfu*-DNA-Polymerase besitzt sowohl eine 5'→3' DNA-Polymeraseaktivität als auch eine 3'→5' Exonuclease Proofreading-Aktivität.

#### 2.2.2.8.1.3 PCR-Ansatz

Für einen 50 µl Ansatz wurden die Komponenten zu folgenden Anteilen gemischt:

Template:	10-100 ng
1,5 µl Forwardprimer:	10 pmol/µl
1,5 µl Reverseprimer:	10 pmol/µl
5 µl 10 x <i>Pfu</i> -Polymerase Puffer mit 20mM MgSO <sub>4</sub>	1 x
1 µl dNTPs:	je 200 nmol
1 µl <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (recombinant)	2, 5 unit
ad 50 µl reinst H <sub>2</sub> O:	
+ 30 µl Mineralöl	

Der jeweilige Ansatz wurde in das jeweils entsprechende Temperaturprogramm eingesetzt.

### 2.2.2.8.1.4 PCR Temperaturprogramm

Das Temperaturprogramm der einzelnen PCR Ansätze setzt sich wie folgt zusammen.

#### A. PCR Temperaturprogramme zur Amplifizierung des *dsrc C100* Genfragmentes.

Mit dem folgenden Temperaturprogramm, wurden zur Generierung der beiden überlappenden Genfragmente mit dem gewünschten Basenaustausch, die erste und die zweite PCR durchgeführt.

Ablauf	Temperatur in °C	Zeitdauer
Initiale Denaturierung	96	1 Minute
Denaturierung	96	30 Sekunden
Primeranlagerung	54, 2	45 Sekunden
Synthesephase	72	1 Minute
Schleife 4 an 2		25 x
Elongation	72	5 Minuten
Kühlung	4	∞

**Tabelle 2.3: PCR Temperaturprogramm zur Amplifizierung der beiden überlappenden *dsrc C100* Genfragmente.**

Zur Fusion der beiden amplifizierten überlappenden Genfragmente wurde die dritte PCR eingesetzt, bei der das folgende Temperaturprogramm genutzt wurde.

Ablauf	Temperatur in °C	Zeitdauer
Initiale Denaturierung	96	3 Minuten
Denaturierung	96	30 Sekunden
Primeranlagerung	50	2 Minuten
Synthesephase	72	1 Minute
Schleife 4 an 2		35 x
Elongation	72	5 Minuten
Kühlung	4	∞

**Tabelle 2.4: PCR Temperaturprogramm zur Fusion der beiden ersten PCR Amplifikate.**

**B. PCR Temperaturprogramm zur Amplifizierung des *dsrC C111* Genfragmentes**

Mit dem folgenden Temperaturprogramm wurden, zur Generierung der beiden überlappenden Genfragmente mit dem gewünschten Basenaustausch, die erste und die zweite PCR durchgeführt.

Ablauf	Temperatur in °C	Zeitdauer
Initiale Denaturierung	96	1 Minute
Denaturierung	96	30 Sekunden
Primeranlagerung	51,6	45 Sekunden
Synthesephase	72	1 Minute
Schleife 4 an 2		35 x
Elongation	72	5 Minuten
Kühlung	4	∞

**Tabelle 2.5: PCR Temperaturprogramm zur Amplifizierung der beiden überlappenden *dsr C C111* Genfragmente.**

Zur Fusion der beiden ersten Amplifikate wurde das folgende Temperaturprogramm genutzt.

Ablauf	Temperatur in °C	Zeitdauer
Initiale Denaturierung	96	3 Minuten
Denaturierung	96	30 Sekunden
Primeranlagerung	50	2 Minuten
Synthesephase	72	1 Minute
Schleife 4 an 2		20 x
Elongation	72	5 Minuten
Kühlung	4	∞

**Tabelle 2.6: PCR Temperaturprogramm zur Fusion der beiden ersten Amplifikate**

Zur Amplifikation des *dsrc C100/111* wurde das amplifizierte *dsrc C100* als Ausgangstemplate gewählt. Die verwendeten Oligonukleotide und das Temperaturprogramm entsprachen denen, die für die Generierung des *dsrc C111* Genfragmentes eingesetzt wurden.

## 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.3.1 Expression der rekombinanten, löslichen Proteine DsrC, DsrC C100S, DsrC C111S und DsrC C100S/C111S

Die Expression von pETCEX mit unterschiedlichen Mutationen, erfolgte mit Hilfe des pET-Expressionssystems in *E. coli* BL21(DE3). Das pET-Expressionssystem ist aufgrund der hohen Selektivität der T7-Polymerase für ihre Promotorsequenz und ihrer starken Aktivität ein strikt kontrolliertes, aber hocheffizientes Expressionssystem (Studier und Moffat, 1986; Studier et al., 1990). Die Gensequenz des *dsrc* (Pott-Sperling, 2000) sowie seiner Mutanten, wurden über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* in den Expressionsvektor pET15b inkloniert. Mit den erhaltenen pET15bdsrC C100, pET15bdsrC C111 und pET15bdsrC C100/111 Plasmiden wurden *E. coli* BL21(DE3) Zellen transformiert. Für die Isolierung und

Reinigung der Proteine, wurde *E. coli* BL21(DE3) mit dem entsprechenden Expressionsvektor in 5 ml LB-Flüssigmedium mit Ampicillin angezogen. Für die Expression wurde die Hauptkultur mit dieser Vorkultur auf eine optische Dichte von  $OD_{600} \approx 0,05$  angeimpft und bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem Inkubationsschüttler bebrütet. Das Volumen der Hauptkultur wurde je nach Bedarf auf 100 ml bis 400 ml eingestellt. Die Zelldichte wurde mit einem Spektralphotometer verfolgt. Bei einer optischen Dichte von  $OD_{600} \approx 0,6$ , wurde die Expression des Zielgens (*dsrC*) mit einer Endkonzentration von 1 mM  $\beta$ -Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert. Die Expression des rekombinanten DsrC Proteins sowie der mutagenen, rekombinanten DsrC Proteine erfolgte über zwei Stunden unverändert bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 180 rpm. Vor und nach der Induktion wurden jeweils 500  $\mu\text{l}$  Kultur zur Analyse auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel entnommen. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben. Das Bakterienpellet wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.3.2 Quantitative Proteinbestimmung mittels UV-Spektroskopie**

Diese Bestimmung der Protein Konzentration beruht auf dem Lambert-Beerschen Gesetz. Demzufolge ist es möglich, die Konzentration einer Substanz über die Schwächung der Strahlenintensität von monochromatischem Licht beim Durchgang durch eine absorbierende Lösung dieser Substanz zu bestimmen. Die Proportionalität zwischen Extinktion (Absorption) der Proteinlösung für Licht einer bestimmten Wellenlänge ( $\lambda$ ) und Konzentration der Lösung wird durch einen spezifischen Proportionalitätsfaktor, den Extinktionskoeffizienten [ $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ] charakterisiert. Der Extinktionskoeffizient der vermessenen Proteine wurde mit dem im Internet frei zugänglichen „Prot Param Tool“ ([http:// au.expasy.org/tools/protparam.html](http://au.expasy.org/tools/protparam.html)) bestimmt. Das Programm errechnet die Extinktionskoeffizienten für verschiedene Wellenlängen (Gill und von Hippel, 1989).

Die Proteinlösungen wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm vermessen, und die Konzentration wurde anhand des entsprechenden Extinktionskoeffizienten errechnet.

### **2.2.3.3 Analyse von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

#### **2.2.3.3.1 Herstellung des Gels**

Die verwendeten Polyacrylamid-Gele wurden über eine radikalische Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylen-Bisacrylamid erstellt, wobei das N,N'-Methylen-Bisacrylamid als Quervernetzer diente. Der Radikalbildner Ammoniumpersulfat (APS) wurde als Polymerisationsstarter eingesetzt. N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurde als Radikalvermittler der Polymerisationsreaktion zugesetzt. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach 45 Minuten war das Gel soweit polymerisiert, dass das Wasser entfernt werden konnte. Anschließend wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet, zur Taschenbildung wurde ein Kamm eingesetzt. Es wurden 15 % ige Gele hergestellt.

Lösung	Sammelgel (4,5 %)	Trenngel (15 %)
Aqua reinst	3 ml	3 ml
Acrylamidlösung	0,75 ml	6 ml
Puffer A	-	3 ml
Puffer B	1,5 ml	
10 % (w/v) APS	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	5 µl

**Tabelle 2.7: Zusammensetzung eines 15 %igen SDS-PAGE**

**Stammlösungen:**

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

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

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

**APS:** 10 % (w/v)

**TEMED:** 5 µl

**2.2.3.3.2 Durchführung der Elektrophorese**

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels der diskontinuierlichen Sodiumdodecylsulfat (SDS) Polyacrylamid (PA)-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Die Diskontinuität bezieht sich dabei auf die Gelstruktur (ein großporiges Sammelgel ist dabei einem engporigen Trenngel aufgelagert), den pH-Wert und die Art und Konzentration der Ionen in den

einzelnen Puffern. Die Proteinlösungen wurden mit 4x Roti-Load-Puffer (reduzierend) oder 2 x SDS-Probenpuffer (nicht reduzierend) gemischt und 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Das SDS in den Puffern bindet an die Proteine, die aufgrund dessen in ihre Untereinheiten dissoziieren. Die Polypeptidketten entfalten sich dabei. Die denaturierten, mit SDS beladenen Proteine weisen ein fast identisches Verhältnis von Ladung und Masse auf. Nach Anlegen der elektrischen Spannung wandern die Protein-SDS-Komplexe in das Gel ein. Kleinere Proteine wandern schneller in die Poren des Gels ein als große Proteine. Die Elektrophorese erfolgte mit 1 x Elektrophoresepuffer in einer Minigelkammer der Firma Biorad (München) für ca. 3 Stunden bei einer Spannung von 100 V. Es wurden 15 %ige Polyacrylamid-Trenngele und 4 %ige Sammelgele eingesetzt. Die Gele wurden anschließend in Coomassie Färbelösung gefärbt.

**Stammlösung:**

**5x Elektrophoresepuffer:** 25 mM Tris/HCl, 250 mM Glycin,  
0,1 % (w/v) SDS  
Nicht titrieren! pH stellt sich auf ca. 8,8 ein.

**reduzierender 4 x Probenpuffer:** 4 x Roti-Load-Puffer;

**nicht reduzierender 2 x SDS-Probenpuffer:** 25ml 4 x Tris/HCl (pH 6,8), 20 ml Glycerin,  
4 g SDS; 1 mg Bromphenolblau ad 100 ml  
reinst H<sub>2</sub>O

### **2.2.3.4 Analyse von Proteinen in Abwesenheit von SDS, mittels nativer Elektrophorese**

Da für weitere Untersuchungen die Proteinkomplexe erhalten bleiben sollten, wurde die native Elektrophorese genutzt, das heißt, es wurden nur SDS freie Puffer zum Gießen der Gele und für die folgende Elektrophorese eingesetzt. Mit Hilfe der nativen Elektrophorese werden Unterschiede zwischen Proteinen dargestellt, die sich auf den nativen Zustand beziehen. Dazu gehören die Ladung sowie das Volumen der Proteine. Die Bildung von Komplexen lässt sich beobachten. Es wurden 7,5 %ige und in wenigen Fällen 10 %ige Trenngele und 4,5 %ige Sammelgele verwendet. Die Proteinproben wurden mit 4 x Probenpuffer in einem Verhältnis von 1:4 versetzt und direkt auf das Gel aufgetragen. Während der gesamten Elektrophorese wurde zur Vermeidung einer Denaturierung die Elektrophoresekammer mit einem Wasserbad gekühlt. Die Proteine wandern bei der nativen

PAGE gemäß ihrer nativen Form entsprechend ihrer Komplexstruktur, Nettoladung und Größe. Die Stammlösungen wurden bei den nativen Gelen ohne SDS angesetzt.

Lösung	Sammelgel (4,5 %)	Trenngel (7,5 %)	(10 %)
Aqua reinst	3 ml	6 ml	5 ml
Acrylamidlösung	0,75 ml	4 ml	3 ml
Puffer A	–	3 ml	3 ml
Puffer B	1,5 ml		
10 % (w/v) APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	5µl	5 µl

**Tabelle 2.8: Zusammensetzung eines 7,5 %igen nativen Gels**

**Stammlösungen ohne SDS:**

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

**Puffer A:** 1,5 M Tris/HCl, (pH 8,8);

**Puffer B:** 0,5 M Tris/HCl, (pH 6,8);

**APS:** 10 % (w/v)

**TEMED:** 5 µl

**5x Elektrophoresepuffer:** 25 mM Tris/HCl, 250 mM Glycin,

Nicht titrieren! pH stellt sich auf ca. 8,8 ein.

**4 x Probenpuffer für**

**native Gele:** 100 mM Mops (pH 6,8 ); 40 % Glycerin, 0,014 %

Bromphenolblau

Bei -70°C lagern

**2.2.3.5 Coomassie Färbung**

Die SDS-PAGE Gele sowie die nativen Gele wurden über Nacht in Coomassie-Färbelösung inkubiert, um die aufgetrennten Proteine nachzuweisen. Coomassie-Brilliant-Blue bindet im sauren Milieu irreversibel an Proteine. Auf diese Weise werden die Proteine nach Entfernen des ungebundenen Farbstoffes sichtbar. Die Nachweisgrenze für Coomassie gefärbte SDS-PAGE Gele liegt bei >1,5 µg Protein. Die Entfärbung der Gele erfolgte über 2-5 Stunden bzw.

über Nacht, bis der gewünschte Grad der Entfärbung erreicht war. Die Entfärberlösung wurde drei bis viermal gewechselt. Zur dauerhaften Aufbewahrung erfolgte die Trocknung der Gele mittels einer Vakuumpumpe bei 65°C und ca. 2 Stunden. Die getrockneten Gele wurden mit einem Scanner aufgenommen und dokumentiert.

**Stammlösungen:**

**Coomassie-Färbelösung:** 45 % Methanol, 10 % Essigsäure, 1 % Coomassie Blue R-250,  
45 % H<sub>2</sub>O

**Entfärberlösung:** 10 % Essigsäure, 20 % Methanol, 70 % H<sub>2</sub>O

### 2.2.3.6 Aufreinigung des Proteins

#### 2.2.3.6.1 Zellaufschluss und Gewinnung des löslichen Gesamtzellproteins

Das aufzuarbeitende Zellpellet wurde für 15 min langsam bei 4°C aufgetaut. Um eine Denaturierung oder einen enzymatischen Abbau von Proteinen zu minimieren, wurde im Folgenden immer eisgekühlt (4°C) und mit gekühltem Puffer gearbeitet. Das Pellet wurde in 1/50 des ursprünglichen Kulturvolumens Lysispuffer resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Dem folgte eine Ultraschall-Behandlung (1 min/ml), um die Zellen aufzubrechen. Zur Abtrennung von Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen, wurde für 30 min bei 25000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen. Der Überstand wurde ohne vorheriges Einfrieren direkt in einer Affinitätschromatographie eingesetzt. Es wurde eine manuelle Aufarbeitung mit Ni<sup>2+</sup> NTA-Agarose für Proteinvolumina von 5-10 ml durchgeführt

#### 2.2.3.6.2 Affinitätschromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose

Rekombinantes DsrC, DsrC C100S, DsrC C111S und DsrC C100S/C111S wurden als lösliche Proteine exprimiert. Diese Proteine besitzen zusätzlich am N-Terminus sechs aufeinander folgende interne Histidin-Reste. Derartig getaggte Proteine können mit Hilfe einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule (Nickel-Nitriloacetic-Acid, Quiagen, Hilden) nach dem Prinzip der immobilisierten Metallchelate-Chromatographie aufgereinigt werden (Porath et al., 1975).

NTA ist eine vierzählig chelatierende Substanz, die mit vier der sechs Liganden-Bindestellen des Nickel-Ions interagiert. Die beiden verbleibenden Liganden-Bindestellen können mit dem 6 x His-Tag interagieren. Auf diese Weise kann das Protein an die Säule binden. Zwar gibt es eine große Zahl von Proteinen, die ebenso wie das exprimierte Protein eine hohe Affinität zu  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen haben. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass sie eine ähnlich hohe Affinität wie das mit 6 Histidinen versehene Zielprotein aufweisen. Durch schrittweise Erhöhung der Imidazolkonzentration konnten störende Fremdproteine von der Säule abgelöst werden, ohne dass es zu einem hohen Verlust an Zielprotein kam. 5-10 ml  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose wurde auf eine Polypropylen-Durchflusssäule mit Fritte (Quiagen) pipettiert. Das Säulenmaterial wurde anschließend mit 3 Säulenvolumen Lysispuffer äquilibriert. Auf diese  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose wurden dann 5-10 ml Lysat pipettiert. Das gebundene Protein wurde mit Elutionspuffer von dem Säulchen eluiert.

**Stammlösungen:**

**Lysispuffer:** 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, (pH 8,0)

**Elutionspuffer:** siehe Lysispuffer mit Imidazol in Konzentrationen von 20-500 mM

### 2.2.3.6.3 Dialyse der Eluate

Um Salze und Imidazol zu entfernen, wurden die Proteine, die über die Affinitätschromatographie an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Agarose eluiert wurden, dialysiert. Das bei bestimmten Imidazolkonzentrationen eluierte Protein wurde in Dialyseschläuche der Firma Servapor, Serva (Feinbiochemica, Heidelberg/New York) überführt. Die Dialyse erfolgte bei 4°C über Nacht auf einem Rührer in einem Volumen von 2,5 l Dialysepuffer. Die gesamte Vorgehensweise wurde am folgenden Morgen wiederholt. Es erfolgte nochmals eine Dialyse für zwei Stunden in ausgetauschtem Dialysepuffer. Das Ausschlussvolumen der Dialyseschläuche betrug 6-8 kDa. Alle kleineren Moleküle wurden gegen Puffer ausgetauscht. Das jeweilige Protein blieb so im Dialyseschlauch.

Wurden die Proteine unter reduzierenden Bedingungen dialysiert, so erfolgte zum Dialysepuffer die Zugabe von TCEP in einer Endkonzentration von 1 mM.

**Stammlösungen:**

**Dialysepuffer für die rekombinanten DsrC**

**Proteine:** 50 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0)

#### 2.2.3.6.4 Aufkonzentrierung der Proteindialysate

Zur Aufkonzentrierung von Proteinlösungen wurden Microcon YM-10 Zentrifugemembranfiltereinheiten der Firma Millipore (Bedford; USA) eingesetzt. Diese Membranfiltersysteme haben eine Ausschlussgröße von 6-8 kDa. Pufferbestandteile und Wasser können die Membran passieren, Proteine größer als 10 kDa werden zurückgehalten. Die mit Proteinlösung befüllten Membranfiltersysteme wurden in der Beckmann Zentrifuge im JA 25.50 Rotor bei 3000 x g und 4°C zentrifugiert. Auf diese Weise wurden ca. 10 ml Proteinlösung in ca. 3-4 Stunden auf ca. 2 ml konzentriert.

#### 2.2.3.6.5 Gelfiltrationschromatographie

Um einerseits besonders reines Protein zu erhalten und andererseits Monomer und Dimer zu trennen, wurde eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt, bei der die Trennung der Proteine auf ihrer unterschiedlichen Molekülgröße beruht. Als Gelmatrix werden kugelförmige Polymere verwendet, die in Abhängigkeit ihres Vernetzungsgrades porös sind. In die Poren dieser Matrices können sich kleinere Proteine geeigneter Größe festsetzen. Ihre Retentionszeit vergrößert sich dadurch. Größere Proteine können sie sich nicht in den Poren festsetzen und durchlaufen die Gelmatrix mit höherer Fließgeschwindigkeit und eluieren vor den niedermolekularen Proteinen.

Um das Molekulargewicht der Proteine bestimmen zu können, wurde die Gelfiltrationssäule Superdex<sup>TM75</sup> mit Standardproteinen bekannter Größe geeicht. Von den folgend aufgeführten Proteineichlösungen wurden jeweils 200 µl in einer Konzentration von 2 mg/ml eingesetzt: Aprotinin (6,5 kDa); Cytochrom c aus Pferdeherz: (12,4 kDa); Ribonuklease A (13,7 kDa); Chymotrypsinogen (25 kDa); Ovalbumin (43 kDa); Rinderserumalbumin (67 kDa). Mit Hilfe des ermittelten Elutionsvolumens (ve) der Standardproteine konnte der  $K_{av}$ -Wert berechnet werden [ $K_{av}=(ve-v_a)/(v_t-v_a)$ ]. Aus dem Chromatogramm kann für jeden eluierten Peak das Elutionsvolumen (ve) abgelesen werden, das von der Probenaufgabe bis zum erscheinen des Peakmaximums über die Säule gepumpt wird. Es hängt vom totalen Säulenvolumen (vt) und der Qualität der Säulenpackung ab. Bei der Superdex75<sup>TM</sup> Säule wird vom Hersteller ein Säulenvolumen von  $v_t = 124$  ml angegeben. Die Bestimmung des Volumens der mobilen Phase in der Säule, das als Ausschlußvolumen ( $v_a$ ) bezeichnet wird, erfolgt durch Dextran Blau 2000. Dieses Molekül ist so groß, dass es von der Diffusion auch in die größten

Hohlräume des Säulenmaterials ausgeschlossen ist und damit ohne Bindungsaffinität durch das Säulenmaterial wandert.

Der Kav-Wert setzt das Elutionsvolumen ( $v_e$ ) mit dem Ausschlussvolumen ( $v_a$ ) und dem Gesamtvolumen ( $v_t$ ) der Säule in Beziehung und wird gegen den log des Molekulargewichts der Eichproteine aufgetragen. Auf diese Weise kann das Molekulargewicht von Proteinen unbekannter Größe ermittelt werden.

Die Gelfiltrationssäule Superdex<sup>TM75</sup> [Amersham Pharmacia Biotech. Com. (Freiburg)] mit einem Bettvolumen von 124 ml und einen Trennbereich von 3-70 kDa, wurde mit Laufpuffer über Nacht bei einer Flussrate von 0,2 ml/min äquilibriert. Das eingesetzte Volumen zur Äquilibration entsprach dreimal dem Volumen der Säulendimension von 124 ml.

Bevor das rekombinante DsrC Protein sowie die mutierten, rekombinanten DsrC Proteine nach der Dialyse in NaCl/ Tris/HCl Puffer, pH 7,5 auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen wurden, wurden verunreinigende Partikel entfernt. Dies erfolgte entweder durch kurze Zentrifugation der Probe oder durch Filtrieren mit einem Sterilfilter [Porengröße 0,45  $\mu$ m (Roth)]. Ebenso wurde der verwendete Laufpuffer unmittelbar vor seiner Anwendung entgast und filtriert [Cellulosenitrat, Porengröße 0,45  $\mu$ m (Sartorius)]. Die Elution des jeweiligen Proteins erfolgte mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Pro Fraktion wurde 1 ml gesammelt. Die UV Detektion machte proteinhaltige Fraktionen sichtbar.

Von den Fraktionen, die das DsrC Protein bzw. dessen Mutanten laut UV-Detektion und Chromatogramm enthielten, wurden je 15  $\mu$ l entnommen und mit 2 x SDS Probenpuffer versetzt (siehe Kapitel 2.2.2.4.3). Anschließend wurden die Proben auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Zuletzt erfolgte wiederum eine Aufkonzentrierung der Fraktionen, die das Monomer enthielten und der Fraktionen, die das Dimer enthielten. auf ca. 2 ml Proteinlösung (siehe Kapitel 2.2.2.7.4).

Die Gelfiltrationen wurden für die verschiedenen DsrC Proteine auch unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Der Unterschied zu der zuvor geschilderten Durchführung bezieht sich auf die Zugabe des Reduktionsmittels TCEP in einer Endkonzentration von 1 mM.

**Säule:** HiLoad 16/60 Superdex Tm<sup>75</sup> Fertigsäule (Amersham Pharmacia Biotech Freiburg)

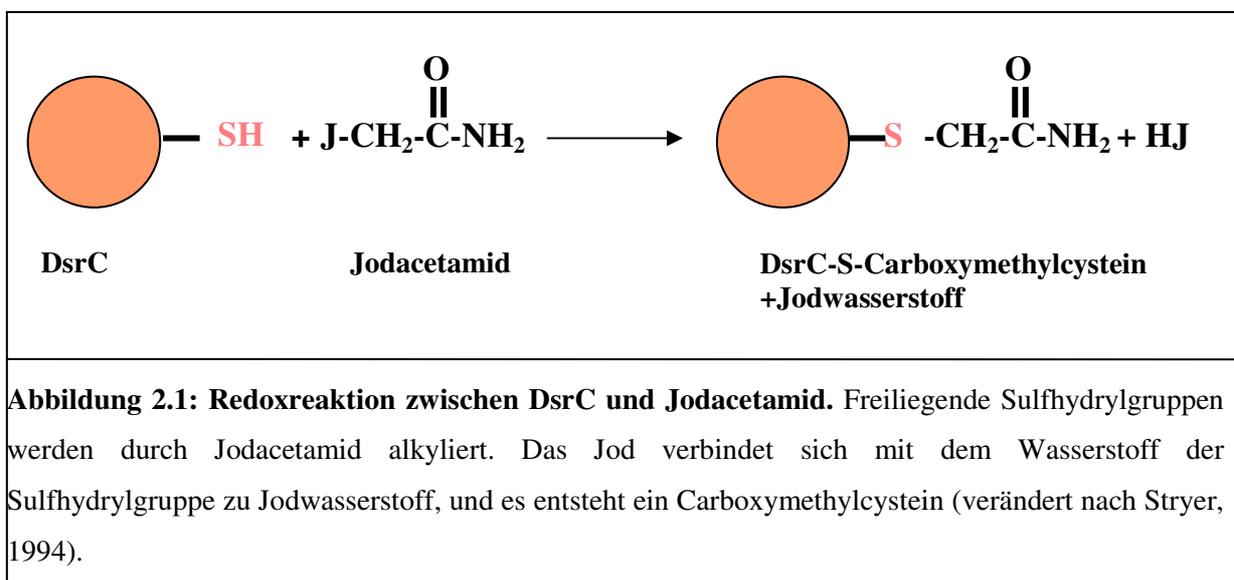
**Stammlösungen:**

**Laufpuffer:** 500 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8

**TCEP:** Zur Durchführung reduzierender Bedingungen (Endkonzentration im Laufpuffer: 1 mM)

### 2.2.3.7 Chemische Modifikation der Proteinkonzentrate mit Jodacetamid

Wegen der speziellen Eigenschaften ihrer Seitenketten kommt der Aminosäure Cystein eine Sonderstellung zu. Von großer Bedeutung für das Verhalten der Cysteine innerhalb eines Proteins ist ihre Sulfhydrylgruppe (-SH). Diese Sulfhydrylgruppe kann mit einem zweiten Cysteinrest unter Bildung einer Disulfidbrücke reagieren. Eine Modifizierung der Sulfhydrylgruppe ermöglicht es stattfindende Reaktionen eingehender zu betrachten. Diese Modifizierung wurde mit Jodacetamid durchgeführt.



Jodacetamid ist in der Lage Sulfhydrylgruppen irreversibel zu methylieren und eine anschließende Oxidation zu verhindern. Proben der aufkonzentrierten Proteine wurden mit Jodacetamid in einer Endkonzentration von 10 mM versetzt und bei Raumtemperatur mit anschließendem fünf Minuten langem Kochen bei 100°C sowie bei 30°C und 6°C über einen Zeitraum von zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit dem entsprechenden Probenpuffer versetzt und auf 15 %ige SDS-PAGES aufgetragen (siehe Kap. 2.2.2.4).

#### Stammlösungen:

**Jodacetamid:** (200 mM); Jodacetamid wird frisch angesetzt und dabei in 500 mM NaCl; 50 mM, Tris/HCl (pH 8) gelöst

### **2.2.3.8 Inkubation von rekombinantem DsrEFH mit rekombinantem DsrC sowie seinen rekombinanten, mutierten DsrC C100S, DsrC C111S und DsrC C100S/C111S Proteinen**

Zur Untersuchung möglicher Interaktionen zwischen rekombinantem DsrEFH und rekombinantem DsrC sowie seiner rekombinanten, mutierten DsrC C100S, DsrC C111S und DsrC C100S/C111S Proteine, erfolgte die Inkubation der Proteine miteinander in verschiedenen Konzentrationen. Zuvor erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentrationen (siehe Kap. 2.2.3.3).

Die Proteinmenge für den eingesetzten DsrEFH Proteinkomplex betrug jeweils 100 pmol.

Die Proteinmengen für die das eingesetzte rekombinante DsrC reichte von 20 -400 pmol

Die Proteinmenge für die mutierten Formen des DsrC Proteins betrug 200 pmol.

Die Versuchsansätze wurden folgendermaßen variiert.

**A:** Die Proteine wurden in nicht reduzierter Form miteinander inkubiert.

**B:** Die Proteine wurden in reduzierter Form miteinander inkubiert.

**C:** Die Proteine wurden in nicht reduzierter Form miteinander inkubiert und es erfolgte eine Zugabe des Reduktionsmittels TCEP (Tris (2-carboxyethyl) phosphine) in der entsprechenden Endkonzentration (siehe Kapitel 3.1.4.1).

Zusätzlich zu jedem Ansatz erfolgte die Zugabe von Inkubationspuffer. Die Zugabe des Probenpuffers für native Gele erfolgte nach der Inkubation über einen Zeitraum von 45 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben über 7,5%ige native Gele analysiert.

#### **Stammlösungen:**

**TCEP:** 50 mM; 5 mM

**Inkubationspuffer:** 100 m M KCl, 5 mM Hepes, 0,01% Tween (pH 7,8)

### 3 Ergebnisse

Das cytoplasmatisch lokalisierte DsrC Protein und die drei cytoplasmatisch lokalisierten Polypeptide DsrE, DsrF und DsrH werden vom *dsr*-Operon des Schwefelpurpurbakteriums *Allochromatium vinosum* kodiert. In einer früheren Arbeit (Schulte, 2005), wurden während der Aufreinigung des rekombinanten DsrC Proteins, unter nicht reduzierenden Bedingungen, zwei Konformationszustände des Proteins detektiert. Es handelte sich dabei um ein Monomer und ein Dimer. Da das DsrC Protein am C-Terminus zwei konservierte Cysteine, das Cystein 100 und das Cystein 111 besitzt, und Cysteine häufig essentiell für die Dimerbildung sind, ergab sich damit die Fragestellung, zwischen welchen Cysteinen die Disulfidbrückenbildung stattfindet, damit die dimere Form des rekombinanten DsrC Proteins gebildet werden kann.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen somit Untersuchungen zur Disulfidbrückenbildung des rekombinanten DsrC Proteins sowie seiner rekombinanten, mutierten Proteine DsrC C100S, DsrC C111S und DsrC C100S/C111S, die zur Identifizierung der entsprechenden Cysteine in dieser Arbeit neu hergestellt wurden.

Ebenso wurden in einer früheren Arbeit die Polypeptide DsrE, DsrF und DsrH aus dem Cytoplasma des Schwefelpurpurbakteriums *Allochromatium vinosum* homogen aufgereinigt. Dabei zeigte sich, dass diese Polypeptide ein Proteinheterohexamer mit der Struktur  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  bilden (Schulte, 2005). Bei der Inkubation des rekombinant, aufgereinigten DsrEFH Proteinkomplexes mit dem rekombinant, aufgereinigten DsrC Protein, wurde in der SDS-PAGE eine Veränderung des DsrEFH Proteinkomplexes beobachtet. Wie genau der Proteinkomplex mit dem DsrC Protein interagiert, blieb jedoch zu klären.

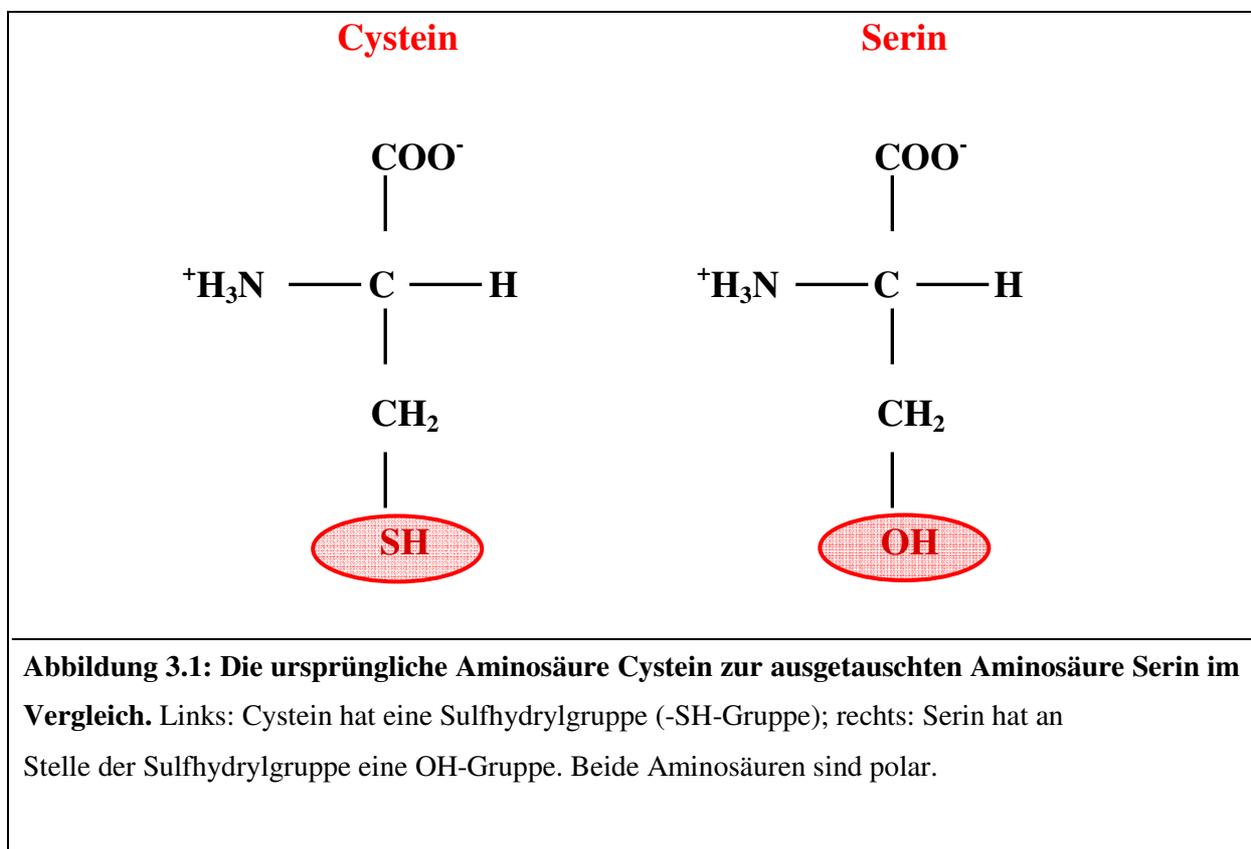
Im zweiten Teil dieser Arbeit beziehen sich die Untersuchungen auf die Interaktionen zwischen dem DsrC Protein mit dem DsrEFH Proteinkomplex. Von besonderem Interesse waren damit auch Inkubationsuntersuchungen zwischen dem Proteinkomplex DsrEFH und den neu hergestellten mutierten DsrC Proteinen.

#### 3.2 Konstruktion der Vektoren

##### 3.2.1 Zielgerichtete Mutagenese zur Herstellung der Mutanten *dsrC C100*, *dsrC C111* und *dsrC C100/111*

Mit dem Verfahren der zielgerichteten Mutagenese besteht die Möglichkeit an definierten Bereichen der DNA Änderungen einzuführen. Diese Änderungen betreffen in den folgenden

Versuchen das Basencodon TGC in der Position (298-300) für Cystein 100 und das Basencodon TGC in der Position (331-333) für Cystein 111, gemessen an der Sequenz für *Allochromatium vinosum*. Innerhalb der Basencodons konnte, mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese, eine einzige Base (Punktmutation) ausgetauscht werden. Der Austausch betraf jedes einzelne der beiden Codons und beide Codons zusammen. Als Konsequenz sollte mit dem jeweils veränderten Codon im Austausch gegen die Aminosäure Cystein die Aminosäure Serin exprimiert werden. Die beiden Aminosäuren Cystein und Serin unterscheiden sich nur hinsichtlich ihrer polaren Gruppe. Cystein besitzt eine Sulfhydrylgruppe, die für die Ausbildung von Disulfidbrücken essentiell ist. Serin besitzt an Stelle der Sulfhydrylgruppe eine OH-Gruppe (siehe Abb. 3.1).



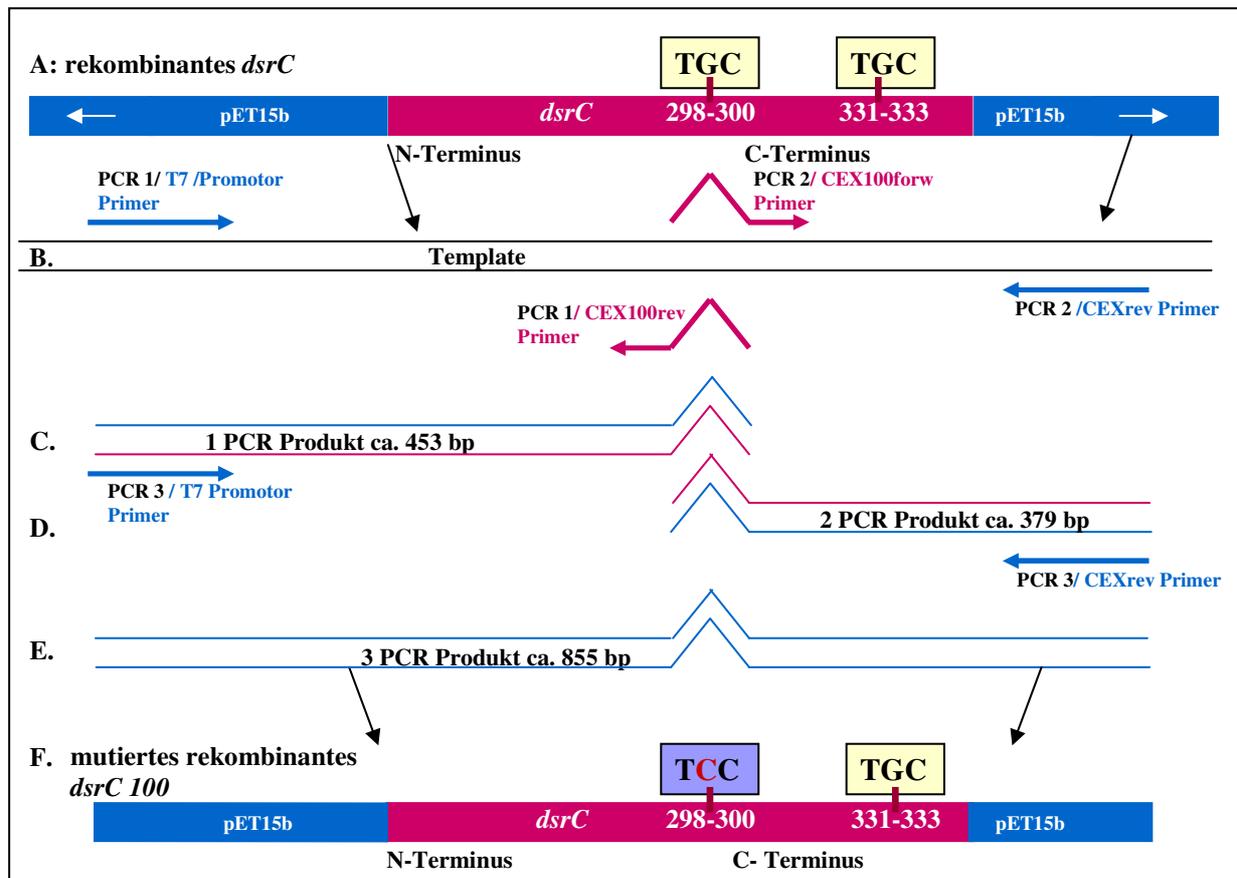
Als Grundlage für alle weiteren Experimente wurden zu Beginn der Arbeit mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese drei Plasmide mit folgendem, mutierten *dsrC* hergestellt, das pET15b *dsrC C100*, pET15b *dsrC C111* und pET15b *dsrC C100/111*.

### 3.1.2.1 pET15b *dsrC* C100

Für dieses Konstrukt wurde im *dsrC* Gen am C-Terminus innerhalb des Basencodons TGC in Position (298-300) die Base Guanin (Position 299) gegen die Base Cytosin ausgetauscht (siehe Abbildungen 3.2 und 3.3), so dass das Basencodon TCC entstand.

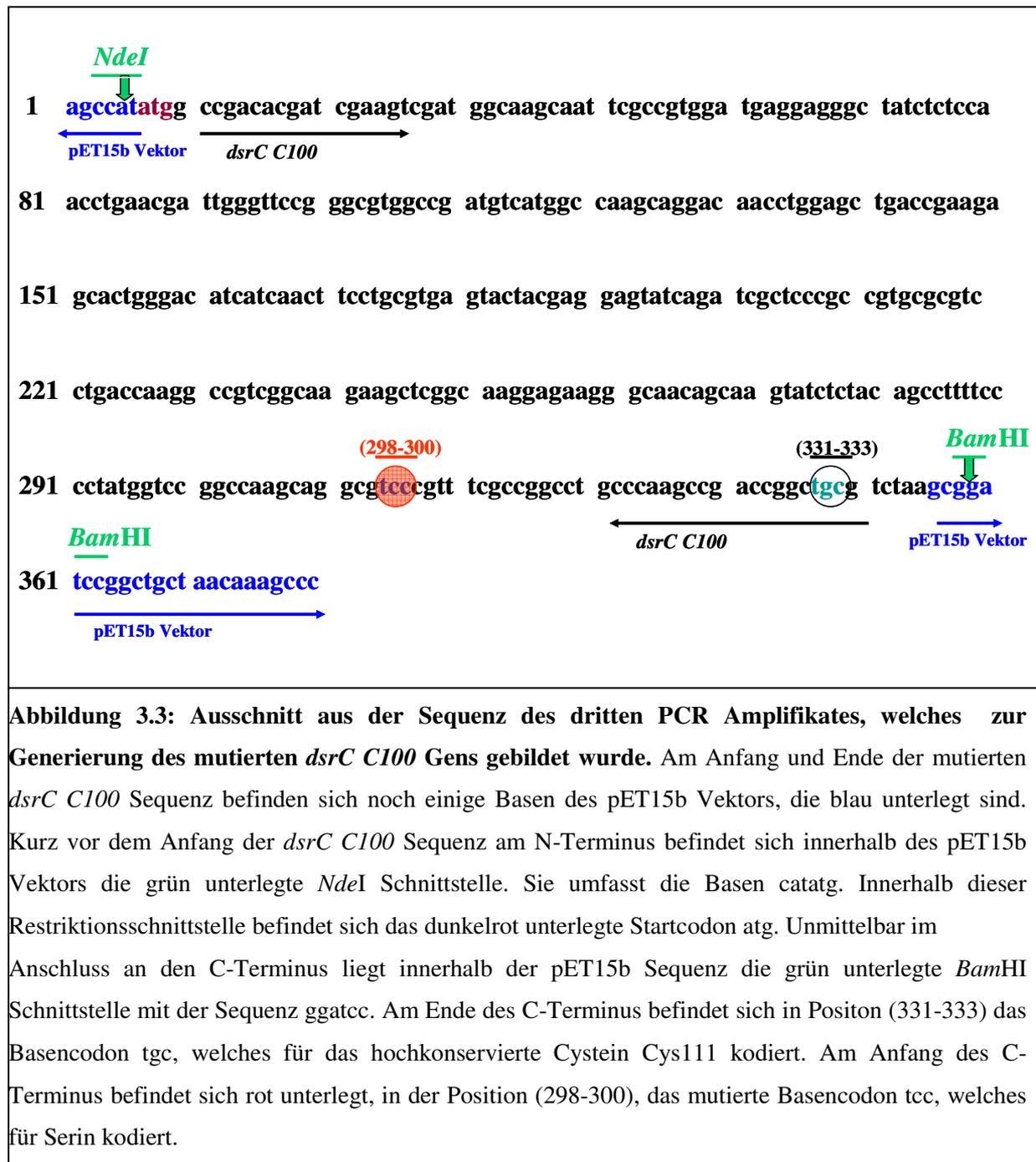
Zur Herstellung der Mutante *dsrC* C100 wurden drei PCR's durchgeführt, um die Punktmutation (Basenaustausch) zu generieren. Insgesamt wurden vier unterschiedliche Primer genutzt. Die beiden inneren Primer waren mutagen. Sie enthielten die Punktmutation und waren jeweils komplementär zum *dsrC* Gen (siehe Kap. 2.2.2.8.1). Diese mutagenen Primer wurden so gewählt, dass sich die Mutationsstelle um eine Base von dem Basencodon des Cysteins unterschied. Letzteres wird innerhalb des *dsrC* Gens, wie bereits oben erwähnt, durch TGC kodiert. Das mutierte Codon hatte die Sequenzfolge TCC. Bei den beiden anderen Primern handelte es sich um die beiden äußeren Primer, den universellen T7 Promotor Primer und den Primer CEXrev, die beide zum pET15b Vektor komplementär sind. Die äußeren Primer entscheiden über die Größe des zu amplifizierenden Gen Fragmentes. Das pETCEX Plasmid, in dem das *dsrC* Gen bereits inkloniert vorlag, diente als Ausgangs Template. Zunächst wurden vom *dsrC* Gen auf den pET15b Vektor übergreifend zwei Fragmente in zwei getrennten PCR Reaktionen amplifiziert. Das erste PCR Produkt, mit einer theoretischen Größe von ca. 453 bp, entstand mit dem äußeren T7 Promotor Primer (forward Primer) und dem mutagenen Primer CEXSer100rev (reverser Primer). Das zweite PCR Produkt wurde mittels des mutagenen Primers CEXSer100forw und dem äußeren Primer CEXrev amplifiziert. Dieses Fragment wies eine theoretische Größe von ca. 379 bp auf (siehe Tabelle 3.1 und Abb. 3.2). Die ungefähre Größenabschätzung erfolgte über den auf dem Agarosegel mitgelaufenen Molekulargewichtsmarker. Die durch diese beiden PCR Reaktionen entstandenen Amplifikate wurden aus dem Agarosegel unter Verwendung des *Quiagen extraction Kit* (Quiagen, Hilden) aufgereinigt. Sie dienten als Template für die dritte PCR. In dieser Fusions PCR mischte man die PCR Produkte der beiden ursprünglichen PCR's mit den beiden äußeren Primern, dem T7 Promotor Primer und dem CEXrev Primer und erhielt somit das Gen Fragment, das in Position 299 an Stelle von Guanin die substituierte Base Cytosin enthalten sollte (siehe Abb. 3.2). Die theoretische Größe dieses dritten Amplifikates von ca. 855 bp (siehe Tabelle 3.1), konnte über den Molekulargewichtsmarker abgeschätzt werden. Im Anschluss an die Aufreinigung des dritten PCR Amplifikates erfolgte die Einklonierung in den Expressionsvektor pET15b. Als Konsequenz davon wurde erwartet, dass das fertige

Konstrukt dann an Stelle der hochkonservierten Aminosäure Cystein 100 die Aminosäure Serin exprimiert.



**Abbildung 3.2: Zielgerichtete Mutagenese des rekombinanten *dsrC* Gens zur Generierung des *dsrC C100*.** A: Dargestellt ist der Ausschnitt aus dem ca. 6000 bp umfassenden pETCEX Vektor, der als Template für die beiden ersten PCR Reaktionen diente. Die eingezeichneten Positionen (298-300) und (331-333) markieren die beiden Codons (TGC), die für die hochkonservierten Cysteine Cys100 und Cys111 kodieren. Unter den Punkten B-D wird gezeigt, wie das Codon (TGC) in Position (298-300) mutiert wurde. B: Hier ist das Template nochmals vereinfacht dargestellt. Es sind die vier Primer eingezeichnet, mit denen die ersten beiden PCR Reaktionen durchgeführt wurden. Mit dem Primerpaar T7 Promotor Primer/Primer CEX100 rev. wurde das unter C dargestellte erste PCR Produkt mit einer Länge von ca. 453 bp generiert. Das zweite PCR Produkt dargestellt unter D, wurde mit dem Primerpaar CEX100forw/ CEXrev amplifiziert. Dieses PCR Produkt hat eine Länge von ca. 379 bp. Das erste PCR Produkt und das zweite PCR Produkt wurden als Template genutzt, um mit dem T7 Promotor Primer und dem CEXrev Primer das dritte PCR Produkt zu generieren. Unter E. ist das dritte PCR Produkt, welches eine Größe von ca. 855 bp hat, dargestellt. F: Hier wird gezeigt wie sich das dritte PCR Produkt anteilmäßig aus dem pET15b Vektor und dem mutierten *dsrC C100 Gen* zusammensetzt. In der Position (298-300) befindet sich rot unterlegt das mutierte Basencodon TCC, welches für Serin kodiert.

An den Enden des amplifizierten dritten Gen Fragmentes, das das mutierte *dsrC C100* Gen enthält, befinden sich zwei verschiedene Restriktionsschnittstellen.



Kurz vor dem *dsrC* Gen, am N-Terminus, liegt eine *NdeI* Schnittstelle. Kurz hinter dem *dsrC* Gen, am C-Terminus, ist eine *BamHI* Schnittstelle zu finden (siehe Abb. 3.3). Nach hydrolytischer Spaltung sowohl dieses dritten amplifizierten Gen Fragmentes als auch des Vektors pET15b, der diese beiden Restriktionsschnittstellen in der Multiple Cloning Site enthält, mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *NdeI*, wurde das rekombinante, mutierte *dsrC C100* in den Expressionsvektor pET15b inkloniert. Aufgrund der Nutzung von zwei

verschiedenen Restriktionsenzymen, ließ sich das PCR Produkt gerichtet in den Vektor pET15b einklonieren. Der pET15b Vektor besitzt ein N-terminales His-Tag, das die spätere Aufreinigung über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographiesäule erleichtert. Der neu konstruierte Vektor erhielt den Namen pETCEX100.

Der fertige Vektor wurde in DH5 $\alpha$  transformiert. Um die gewünschten Mutanten zu isolieren, wurde die DNA der einzelnen Klone mittels der Restriktionsenzyme *PvuI*, *BamHI* und *NcoI* auf die richtige Größe des einklonierten Gen Fragmentes hin überprüft. Im Anschluss daran erfolgte die Sequenzierung der auf die richtige Größe hin selektierten Klone, um zu ermitteln, ob tatsächlich die Base im Basencodon TGC ausgetauscht wurde und um unerwünschte Mutationen auszuschließen.

PCR Produkte	Aminosäureaustausch	Basenaustausch		Länge der PCR Produkte
		altes Codon (298-300)	neues Codon (298-300)	
Erstes PCR Produkt	Cystein (100) gegen Serin	TGC (299) gegen	TCC (299)	ca. 453 bp
Zweites PCR Produkt	Cystein (100) gegen Serin	TGC (299) gegen	TCC (299)	ca. 379 bp
Drittes PCR Produkt	Cystein (100) gegen Serin		TCC (299)	ca. 855 bp

Tabelle: 3.1: Übersicht des Aminosäure- und Basenaustausches zur Bildung von *dsrC C100*, sowie Angaben zu den Größen der einzelnen PCR-Produkte.

### 3.1.2.2 pET15b *dsrC C111*

Für dieses Konstrukt wurde im rekombinanten *dsrC* Gen am C-Terminus diesmal in der Position 331, innerhalb des Basencodons TGC (Position 331-333), die Base Guanin gegen Cytosin ausgetauscht. Es entstand das Basencodon TCC. Auch hier diente das pETCEX Plasmid als Ausgangs Template. Das erste PCR Produkt wurde mit den beiden Primern, T7 Promotor Primer und dem CEX111rev2 Primer amplifiziert. Das entstandene erste Gen Fragment hatte eine Größe von ca. 492 bp. CEXSer111forw2 und CEXrev bildeten das zweite Primerpaar und amplifizierten das zweite Gen Fragment, welches eine Größe von ca. 363 bp aufwies (siehe Tabelle 3.2).

Die beiden amplifizierten Gen Fragmente bildeten das Template für die dritte PCR, die wiederum mit den beiden äußeren Primern, dem T7 Promotor Primer und dem CEXrevers Primer ein Gen Fragment amplifizierten, das eine Größe von ca. 855 bp hatte (siehe Tabelle 3.2). Die Klonierung erfolgte wie unter 3.1.2.1 beschrieben.

PCR Produkte	Aminosäureaustausch	Basenaustausch		Länge der PCR Produkte
		altes Codon (331-333)	neues Codon (331-333)	
Erstes PCR Produkt	Cystein (111) gegen Serin	TGC (332)	gegen TCC (332)	ca. 492 bp
Zweites PCR Produkt	Cystein (111) gegen Serin	TGC (332)	gegen TCC (332)	ca. 363 bp
Drittes PCR Produkt	Cystein (111) gegen Serin		TCC (332)	ca. 855 bp

**Tabelle: 3.2: Übersicht des Aminosäure -und Basenaustausches zur Bildung von *dsrc C111* sowie Angaben zu den Größen der PCR Produkte.**

Zur besseren Übersicht wurden in der Tabelle 3.2, der erfolgte Aminosäure -und Basenaustausch sowie die einzelnen Größen der PCR Produkte dargestellt.

### 3.1.2.3 pET15b *dsrc C100/C111*

Das Plasmid pET15b *dsrc C100*, welches bereits das mutierte Basencodon TCC in der Position (298-300) besitzt, dies wurde durch die Sequenzierung bestätigt, diente als Template für die Herstellung der Doppelmutante pET15b *dsrc C100/C111*. Zur Einführung des zweiten Basenaustausches in Position 332, wurden die beiden Primer Paare T7 Promotor Primer/CEXSer111rev2 und CEXSer111forw2/CEXrev verwendet, die zur Generierung von *dsrc C111* dienten (siehe Kapitel 3.1.2.2). Die beiden generierten Gen Fragmente dienten als Template für die Fusions PCR, in der mit den beiden äußeren Primern, dem T7 Promotor Primer und dem CEXrev Primer das dritte Gen Fragment amplifiziert wurde. Die theoretische Größe des dritten Amplifikates von ca. 855 bp (siehe Tabelle 3.3), wurde über den Molekulargewichtsmarker nochmals bestätigt. Die weitere Klonierung erfolgte wie unter Kapitel 3.1.2.1 beschrieben.

PCR Produkte	Aminosäureaustausch	Basenaustausch		Länge der PCR Produkte
		altes Codon	neues Codon	
Erstes PCR Produkt	Cystein (100) gegen Serin	TGC (299)	TCC (299)	ca. 453 bp
	Cystein (111) gegen Serin	TGC (332)	TCC (332)	ca. 493 bp
Zweites PCR Produkt	Cystein (100) gegen Serin	TGC (299)	TCC (299)	ca. 379 bp
	Cystein (111) gegen Serin	TGC (332)	TCC (332)	ca. 363 bp
Drittes PCR Produkt	Cystein (100) gegen Serin		TCC (299)	ca. 855 bp
	Cystein (111) gegen Serin		TCC (332)	ca. 855 bp

**Tabelle 3.3: Übersicht des Aminosäure -und Basenaustausches zur Bildung von *dsrC C100/C111* sowie Angaben zu den einzelnen Größen der PCR-Produkte.**

Die Tabelle 3.3 stellt nochmals eine kurze Zusammenfassung der erfolgten Aminosäure- und Basenaustausche dar, die zur Bildung von *dsrC C100/C111* führten. Ferner werden die Größen der einzelnen PCR Produkte aufgelistet.

## 3.2 Expression und Aufreinigung der verschiedenen Formen des DsrC Proteins

### 3.2.1 Expression

Um zu überprüfen, ob der jeweilige Expressionsvektor zur Synthese des gewünschten, mutierten DsrC Proteins führte, wurde eine 400 ml Kultur von *E. coli* bis zu einer OD<sub>600</sub> von  $\approx 0,6$  angezogen. Die Expression wurde mit IPTG ausgelöst, das im Kulturmedium eine Endkonzentration von 1 mM hatte. Vor und nach der Induktion wurde jeweils eine Probe entnommen, um in der SDS-PAGE verifizieren zu können, ob die Expression erfolgreich war. Bei allen drei Mutanten fand eine Expression statt. Nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschall wurde jeweils die abzentrifugierte, lösliche Fraktion in den ersten Schritt der Aufreinigung eingesetzt, in die Affinitätschromatographie.

---

### **3.2.2 Reinigung des DsrC Proteins sowie seiner Mutanten DsrC C100S, DsrC C111S und DsrC C100S/111S mittels Affinitätschromatographie**

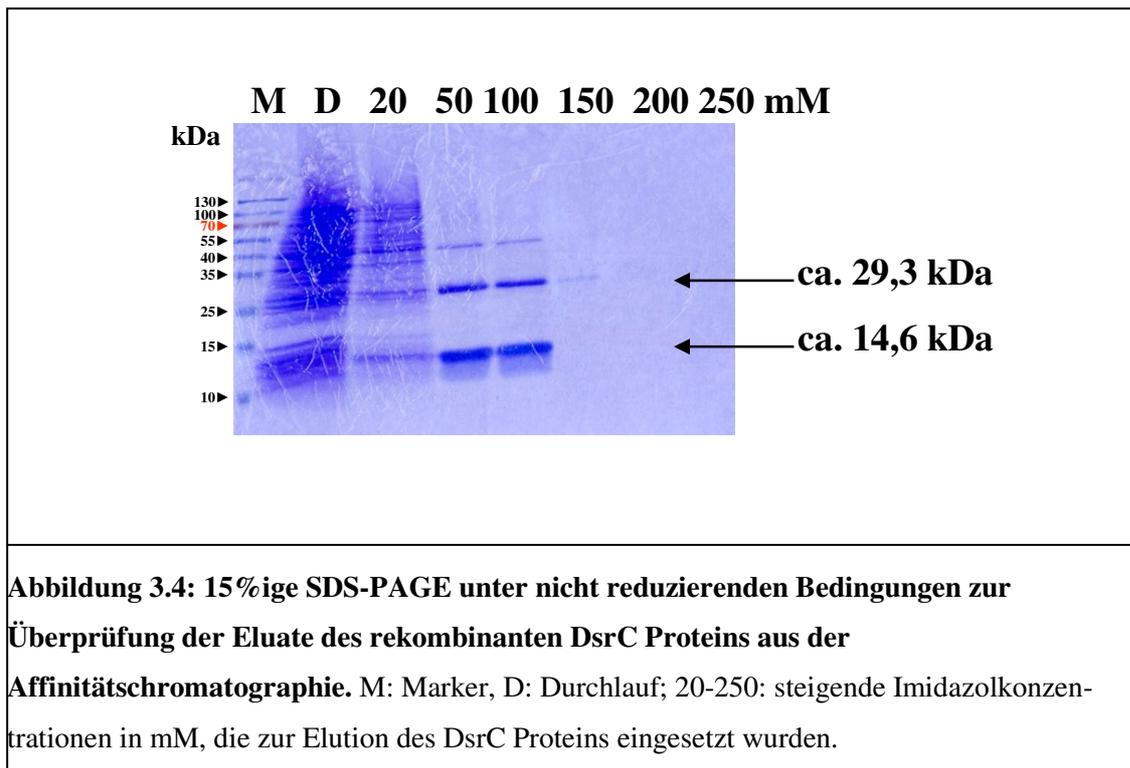
Der erste Aufreinigungsschritt erfolgte durch die Anwendung der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie. Das jeweilige DsrC Protein ist deshalb mit einem sechsfachen Histidinüberhang am N-Terminus versehen (siehe Kap. 2.2.3.6.2).

Im Lysispuffer ist Imidazol bereits in der geringen Konzentration von 10 mM enthalten. Eine Vielzahl von Proteinen wurde schon durch diese Imidazolkonzentration an einer Anbindung an die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Matrix gehindert. Genau wie das exprimierte Zielprotein gibt es aber noch eine große Zahl von Proteinen, die auch eine hohe Affinität zum  $\text{Ni}^{2+}$ -Ion haben. Es ist jedoch nicht wahrscheinlich, dass sie genau die Größe des rekombinanten DsrC Proteins besitzen. Mit ansteigenden Imidazolkonzentrationen von 20-500 mM wurden die verschiedenen Formen der überexprimierten DsrC Proteine eluiert. Diese Versuche wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Um das rekombinante DsrC Protein und seine Mutanten auch unter reduzierenden Bedingungen mittels der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie aufzureinigen, wurde dem Lysispuffer und dem Elutionspuffer (siehe Kap. 2.2.3.6.2) TCEP in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben (Daten nicht gezeigt). Ansonsten unterschied sich die Aufreinigung unter reduzierenden Bedingungen nicht von der Aufreinigung unter nicht reduzierenden Bedingungen.

#### **3.2.2.1 SDS-PAGE zur Überprüfung der Eluate aus der Affinitätschromatographie**

##### **3.2.2.1.1 SDS-PAGE des rekombinanten DsrC Proteins**

Nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschall und abschließender Zentrifugation befand sich das lösliche, rekombinante DsrC Protein im Überstand. Durch ansteigende Imidazolkonzentrationen wurde es eluiert und mittels einer 15%igen SDS-PAGE weiter analysiert (siehe Abb. 3.4)

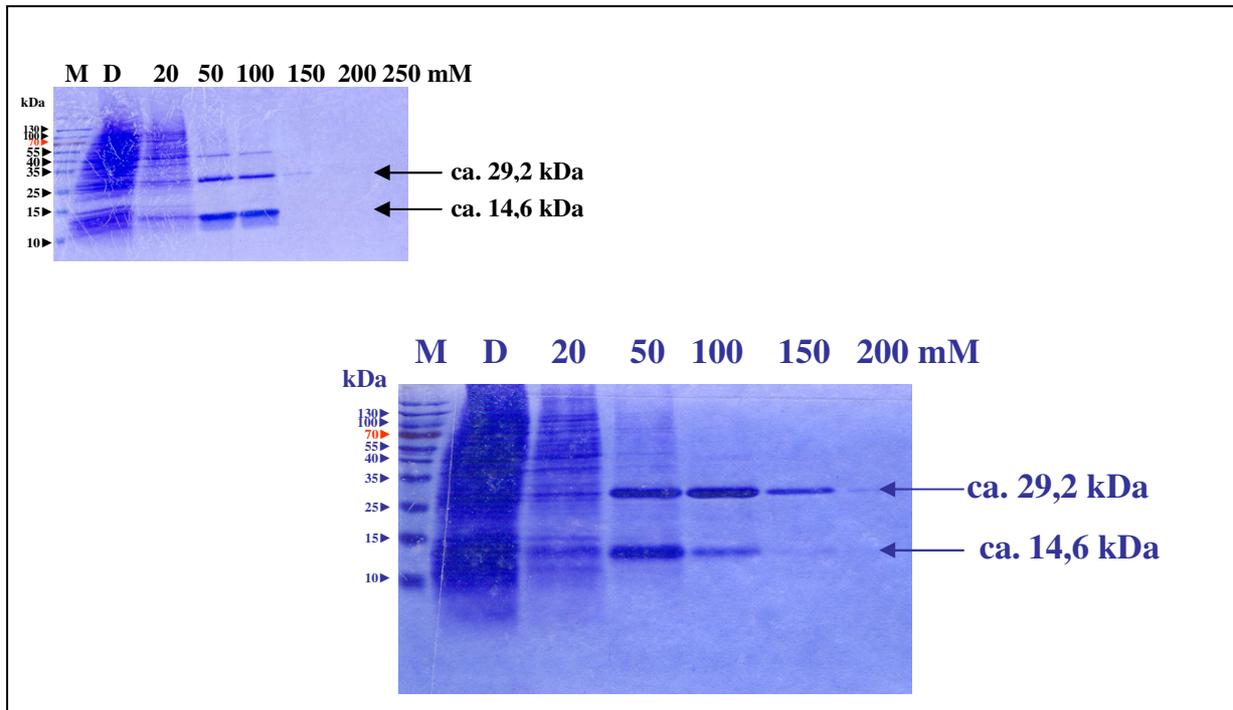


Im Durchlauf befindet sich der Großteil der Proteine, die durch die geringe Imidazolkonzentration von 10 mM schon zu Anfang daran gehindert wurden, an die Ni<sup>2+</sup>-NTA Säule zu binden. Bei einer Imidazolkonzentration von 20 mM im Elutionspuffer wird der Teil der unspezifischen Proteine, die an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule gebunden waren, eluiert. Wie in der Abbildung 3.4 gezeigt, eluierte das rekombinante DsrC Protein bei Imidazolkonzentrationen von 50 und 100 mM. Der Großteil lag nach der Elution in der monomeren Form vor mit einer Größe von ca. 14,6 kDa. Weiterhin wurde das DsrC Protein in der dimeren Form eluiert mit einer Größe von ca. 29,3 kDa. Bei Vergleich der Bandenstärke fällt auf, dass das Monomer quantitativ überwiegt. Nach durchgeführter Affinitätschromatographie lag das rekombinante DsrC Protein in bereits gut aufgereinigter Form vor. Mit Hilfe der SDS-PAGE konnte eine Reinheitsanalyse durchgeführt werden.

### 3.2.2.1.2 SDS-PAGE des rekombinanten, mutierten DsrC C100S Proteins

Bei der Aufreinigung des rekombinanten, mutierten DsrC C100S Proteins mittels Affinitätschromatographie, wurden die gleichen Bedingungen und ansteigenden Imidazolkonzentrationen gewählt wie beim rekombinanten DsrC Protein. Aliquots der

einzelnen Elutionsschritte wurden durch eine SDS-PAGE (15%) unter nicht reduzierenden Bedingungen analysiert (siehe Abb. 3.5).



**Abbildung 3.5: 15%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen zur Überprüfung der Eluate des rekombinanten, mutierten DsrC C100S Proteins aus der Affinitätschromatographie.** Im Vergleich: links oben: SDS-PAGE mit Eluaten des rekombinanten DsrC Proteins; rechts unten: SDS-PAGE mit Eluaten des rekombinanten, mutierten DsrC C100S Proteins. M: Marker, D: Durchlauf, 20-250: steigende Imidazolkonzentrationen in mM, die zur Elution des DsrC C100S Proteins eingesetzt wurden.

Beim Vergleich der beiden SDS-PAGES wird deutlich, dass auch im Durchlauf des DsrC C100S Proteins der größte Anteil, der nicht an die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Säule gebundenen Proteine zu finden ist. Im Durchlauf ist kaum DsrC C100S sichtbar, das bedeutet, dass das Protein im vorliegenden Fall genau wie beim DsrC Protein, vollständig an das Säulchen gebunden hatte. Mit einer Imidazolkonzentration von 20 mM, wurde der Anteil der unspezifisch an die Säule gebundenen Proteine eluiert. Das mutierte DsrC C100S Protein eluierte bei den eingesetzten Imidazolkonzentrationen von 50-150 mM von der Säule. In diesen Stufen ist das DsrC C100S Protein schon weitestgehend frei von Fremdproteinen. Es liegen auch hier 2 Banden vor. Eine Bande in der Größe von ca. 14,6 kDa und eine Bande in der Größe von ca. 29,3 kDa. Die Banden zeigen Unterschiede hinsichtlich der Stärke im Vergleich zum rekombinanten DsrC Protein (Abb. 3.4). Bei dem Anteil des DsrC C100S Proteins, der bei 50 mM Imidazol eluiert

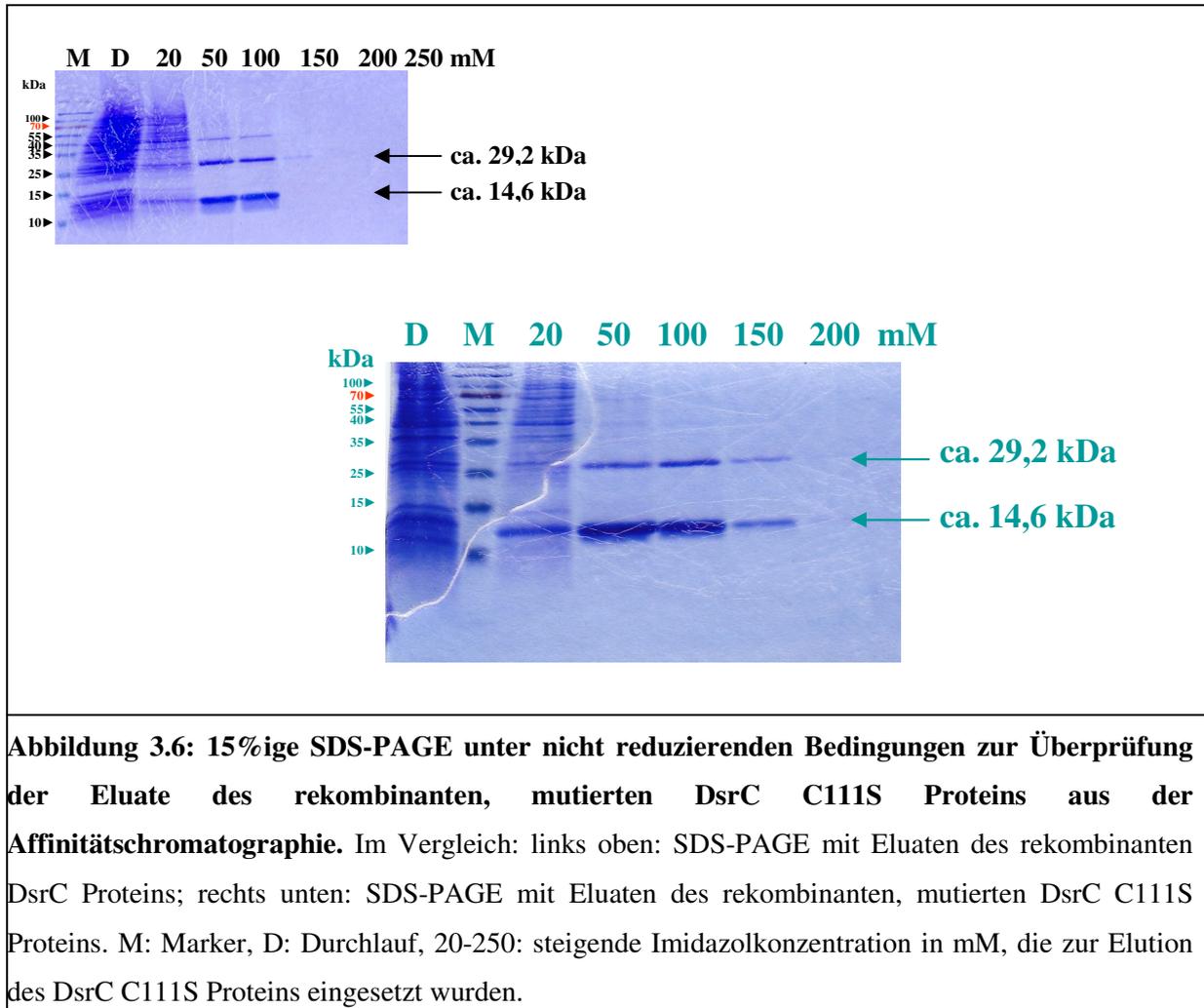
wurde, ist die Bande, die die monomere Form repräsentiert ähnlich stark wie beim rekombinanten DsrC Protein, während die Bande, die die dimere Form repräsentiert eine fast doppelte Intensität aufweist. Bei Verwendung der 100 mM Imidazolkonzentration zur Elution des DsrC C100S Proteins hat sich die bereits zuvor gezeigte größere Intensität der Bande, die die dimere Form repräsentiert, zu Lasten der Bande, die die monomere Form repräsentiert, noch verstärkt.

Im Vergleich zum DsrC Protein liegt beim eluierten DsrC C100S Protein eine eindeutige Verschiebung zugunsten der Bande vor, die die dimere Form repräsentiert.

### **3.2.2.1.3 SDS-PAGE des rekombinanten, mutierten DsrC C 111S Proteins**

Da mit den Imidazolkonzentrationen von 20 bis 250 mM zur Elution des rekombinanten DsrC Proteins und des mutierten DsrC C100S Proteins gute Ergebnisse erzielt wurden, wurden die Abstufungen dieser Imidazolkonzentrationen unverändert beibehalten (siehe Abb. 3.6).

Auch nach durchgeführter Affinitätschromatographie des DsrC C111S Proteins (siehe Abb. 3.6), befand sich im Durchlauf der Anteil der nicht gebundenen, unspezifischen Proteine. Bei 20 mM Imidazol wurde der Anteil der unspezifisch an die Säule gebundenen Proteine eluiert. Allerdings befand sich im 20 mM Imidazoleluat auch eine beträchtliche Menge des Monomers (14,6 kDa Bande) (siehe Abb. 3.6). Wie bereits beim DsrC Protein und der Einzelmutante DsrC C100S, eluierte der Hauptanteil des DsrC C111S Proteins bei Verwendung der 50 und 100 mM Imidazolkonzentrationen. Ein geringer Anteil wurde bei der verwendeten Imidazolkonzentration von 150 mM eluiert. Es gibt jedoch eine Abweichung bezüglich der Bandenstärken gegenüber der beiden Formen DsrC und auch DsrC C100S. Es wurde in den oben erwähnten Fraktionen des DsrC C111S Proteins zum überwiegenden Anteil die monomere Form mit einer Größe von ca. 14,6 kDa eluiert. Die dimere Form, die durch die 29,3 kDa Bande repräsentiert wird, liegt nur zu einem geringen Anteil vor.



**Abbildung 3.6: 15%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen zur Überprüfung der Eluate des rekombinanten, mutierten DsrC C111S Proteins aus der Affinitätschromatographie.** Im Vergleich: links oben: SDS-PAGE mit Eluaten des rekombinanten DsrC Proteins; rechts unten: SDS-PAGE mit Eluaten des rekombinanten, mutierten DsrC C111S Proteins. M: Marker, D: Durchlauf, 20-250: steigende Imidazolkonzentration in mM, die zur Elution des DsrC C111S Proteins eingesetzt wurden.

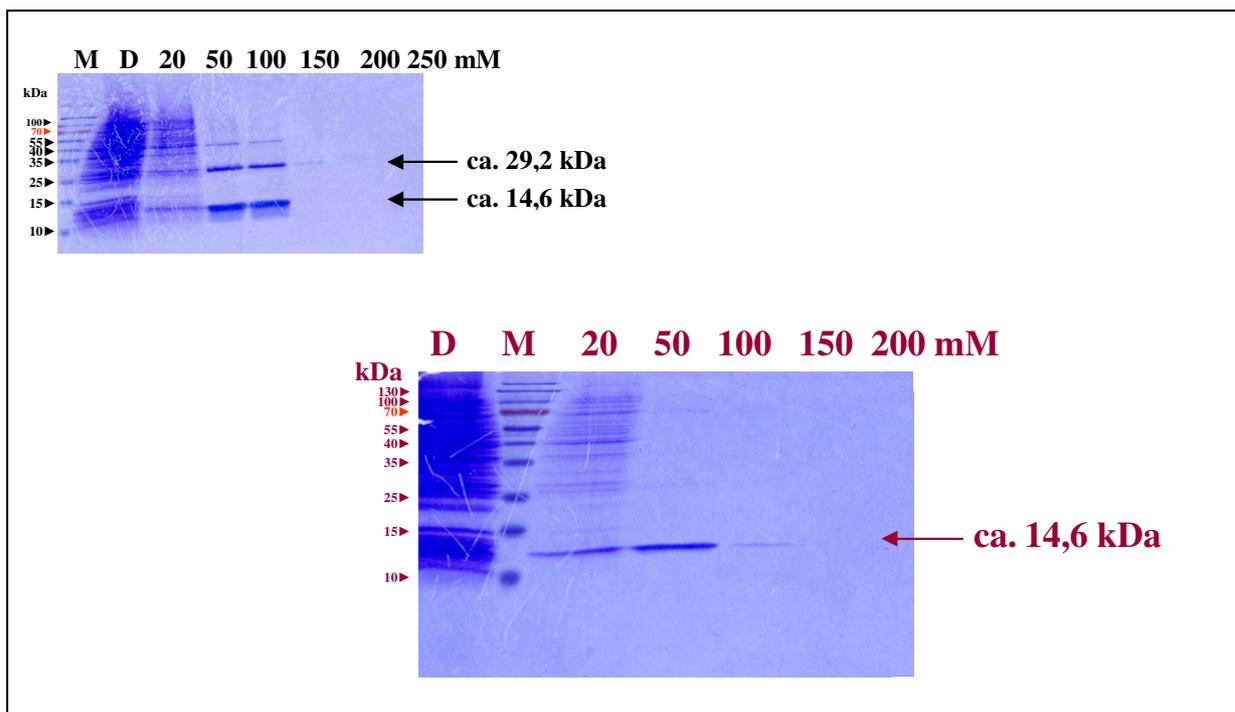
#### 3.2.2.1.4 SDS-PAGE des rekombinanten, mutierten DsrC C100S/C111S Proteins

Als letztes wurde die Doppelmutante DsrC C100S/C111S affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die bisher genutzten Imidazolkonzentrationen wurden auch zur Elution dieser DsrC Form unverändert übernommen (siehe Abb. 3.7).

Der Durchlauf beinhaltete wiederum den Anteil aller, nicht an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule gebundenen Proteine. Die Menge und Stärke der einzelnen Banden ließ keinen Unterschied zu den Durchläufen der rekombinanten DsrC, DsrC C100S und DsrC C111S Proteine (siehe Abb. 3.4; 3.5 und 3.6) erkennen. In den weiteren, mittels SDS-PAGE analysierten Eluaten, zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede (siehe Abb. 3.7) im Vergleich zu den analysierten Eluaten des rekombinanten DsrC Proteins als auch zu denen der beiden mutierten, rekombinanten Proteine DsrC C100S und DsrC C111S. Bereits die Gesamtmenge der eluierten Proteine ist in der 20 mM Fraktion geringer als bei den übrigen aufgereinigten DsrC

Formen. Zudem liegt nach der SDS-PAGE dieser Fraktion bereits eine gut sichtbare Bande mit einer Größe von ca. 14,6 kDa vor, die dem Monomer entspricht. Auch mit dem 50 mM Imidazoleluat wurde die monomere Form eluiert. Eine Bande, die dem Dimer, in der Größe von ca. 29,3 kDa entspricht, konnte in keiner Fraktion nachgewiesen werden.

Das mit Hilfe der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigte DsrC C100S/C111S Protein wurde, im Vergleich zu den anderen DsrC Proteinen, in geringerer Konzentration und ausschließlich in der monomeren Form eluiert.



**Abbildung 3.7: 15%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen zur Überprüfung der Eluate des rekombinanten, mutierten DsrC C100S/C111S Proteins aus der Affinitätschromatographie.** Im Vergleich: links oben: SDS-PAGE der Eluate des rekombinanten DsrC Proteins; rechts unten: SDS-PAGE der Eluate des rekombinanten, mutierten DsrC C100S/C111S Proteins. D: Durchlauf, M: Marker, 20-250: steigende Imidazolkonzentrationen in mM, die zur Elution des DsrC C100S/C111S Proteins eingesetzt wurden.

### 3.2.3 Weitere Aufreinigung der Proteine mit der Gelfiltration

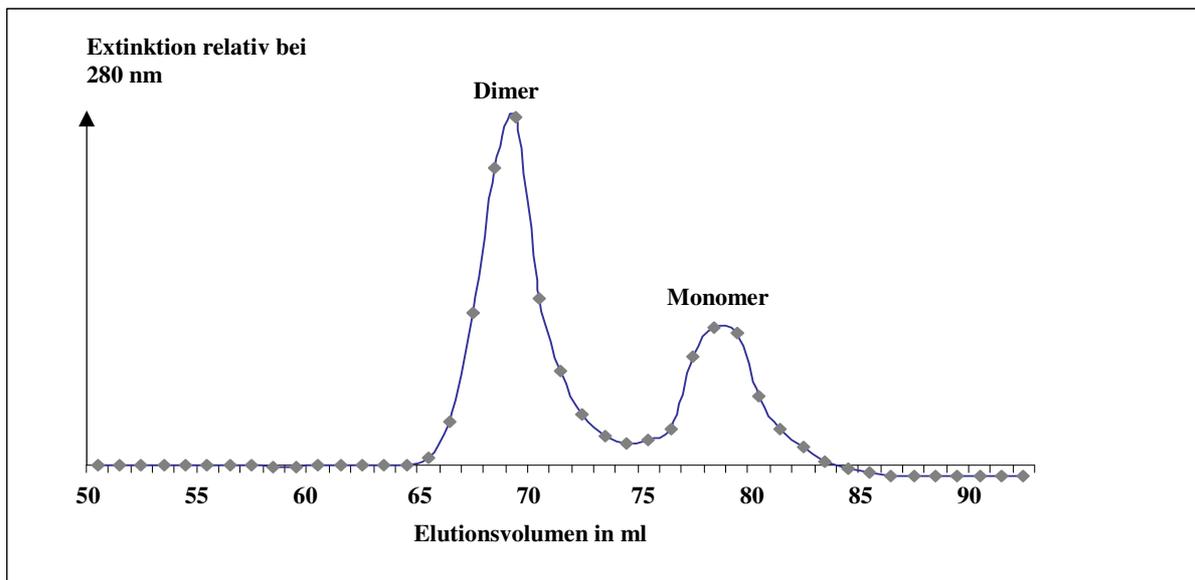
Das DsrC Protein sowie die mutierten DsrC Proteine wurden in einem folgenden Schritt einer Gelfiltration unterzogen. Die beiden auftretenden Formen, das Monomer und das Dimer des jeweiligen DsrC Proteins, sollten mit Hilfe der Gelfiltration voneinander isoliert werden. Die Eluate der Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitätschromatographie, die das jeweilige DsrC Protein ohne

störende Fremdproteine enthielten, wurden vereinigt und ohne Zusatz eines Reduktionsmittels dialysiert. Da das rekombinante DsrC Protein leicht ausfällt, wurde es ebenso wie seine mutierten Formen in einem Puffer dialysiert, der 500 mM NaCl enthielt, um das Protein in Lösung zu halten. Nach Beendigung der Dialyse wurden die Proben auf ca. 2 ml aufkonzentriert und anschließend auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen.

Der Anteil der Proteine, der bereits unter reduzierenden Bedingungen mit Hilfe der Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitätschromatographie eluiert wurde, wurde auch während der Dialyse und Gelfiltration (Daten nicht gezeigt) weiter unter reduzierenden Bedingungen gehalten. Aufgrund dessen wurden dem Dialysepuffer (siehe Kap.2.2.3.6.3) und dem Laufpuffer (siehe Kap. 2.2.3.6.5) für die Gelfiltration, TCEP in einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt. Die Vorgehensweise zur Aufreinigung unter reduzierenden Bedingungen unterschied sich demnach nur in der Zugabe von TCEP.

### 3.2.3.1 Gelfiltration des rekombinanten DsrC Proteins

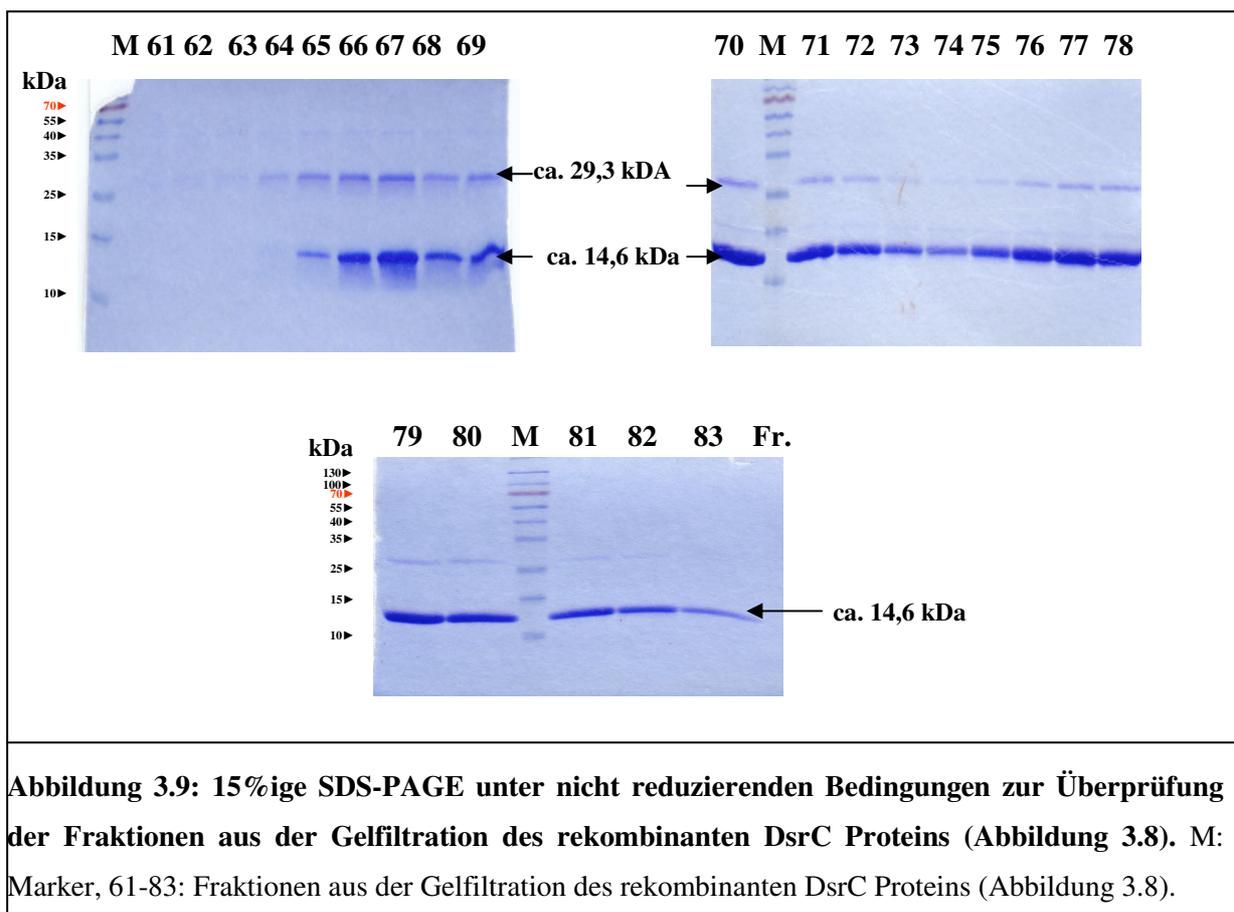
Die Gelfiltration einer rekombinanten DsrC Lösung ergab das unter Abbildung 3.8 dargestellte Chromatogramm.



**Abbildung 3.8: Elutionsprofil der Gelfiltration des rekombinanten DsrC Proteins.**

Das dialysierte und auf 2 ml eingeeengte Eluat aus der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie, wurde auf eine Superdex<sup>TM75</sup> Säule gegeben und eluiert. —◆—: Extinktion relativ bei 280 nm.

Das Chromatogramm zeigt zwei Peaks. Da die Gelfiltrationssäule geeicht war, konnte auf die molare Masse geschlossen werden, die über dem entsprechenden Peak eluiert wurde. Der erste Peak, der fast doppelt so hoch ist wie der zweite Peak, wurde bei den Fraktionen 65 bis 72 ml eluiert und entspricht der dimeren Form des DsrC Proteins mit einer Größe von ca. 29,3 kDa. Der zweite Peak, der bei den Fraktionen 76 bis 83 eluierte, repräsentiert das kleinere Monomer, das eine Größe von ca. 14,6 kDa aufweist. Aliquots der eluierten Fraktionen 61 bis 83 wurden einer 15%igen SDS-PAGE unterzogen (siehe Abb. 3.9). Der Gelelektrophoreselauf erfolgte unter nicht reduzierenden Bedingungen.



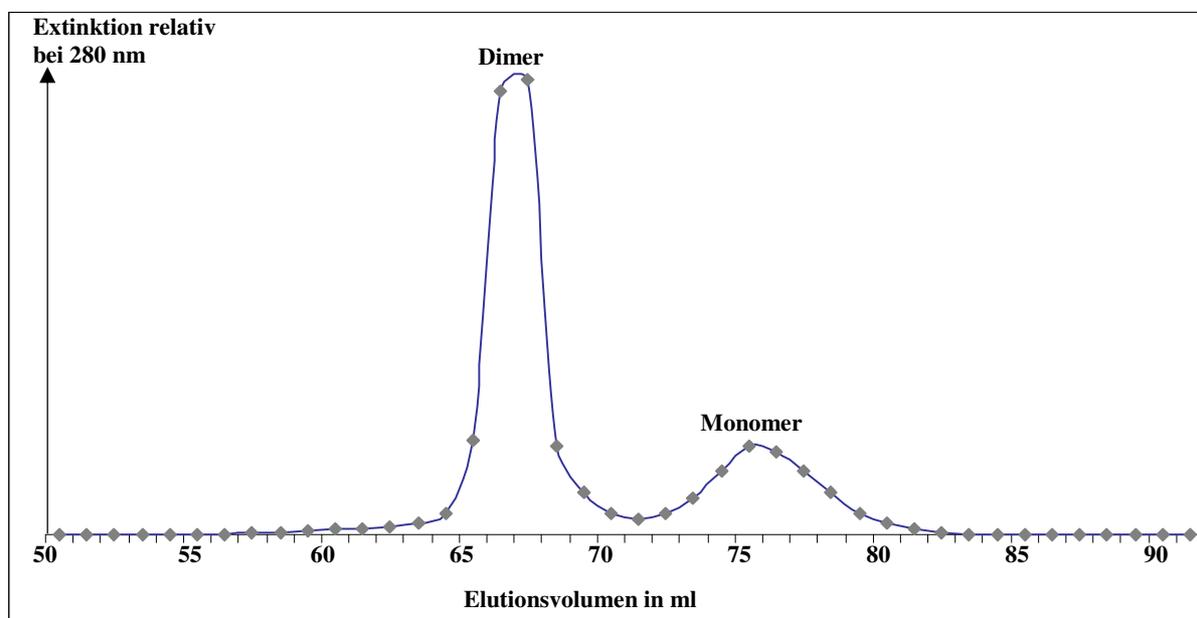
**Abbildung 3.9: 15%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen zur Überprüfung der Fraktionen aus der Gelfiltration des rekombinanten DsrC Proteins (Abbildung 3.8). M: Marker, 61-83: Fraktionen aus der Gelfiltration des rekombinanten DsrC Proteins (Abbildung 3.8).**

Die in der SDS-PAGE (siehe Abb. 3.9) unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennten Fraktionen 65 bis 73, die im Chromatogramm als Dimer detektiert wurden, zeigen jeweils 2 Banden auf. Die Bande, die der monomeren Form des Proteins in der Größe von ca. 14,6 kDa entspricht, dominiert dabei gegenüber der Bande, die die dimere Form des Proteins in der Größe von ca. 29,3 kDa repräsentiert. Die Fraktionen 75 bis 83, die laut Chromatogramm die monomere Form des DsrC Proteins enthalten, zeigen auch nach der SDS-PAGE Analyse fast ausschließlich diese monomere Form des DsrC Proteins. Die Daten des Chromatogramms (siehe Abb. 3.8) und der SDS-PAGE (siehe Abb. 3.9) weichen damit etwas voneinander ab.

Proben aus dem Peak, die im Chromatogramm die dimere Form des DsrC Proteins darstellen, zeigen im SDS-PAGE beide Formen des DsrC Proteins mit einer eindeutigen Dominanz der monomeren Form. Proben aus dem kleineren Peak, der das Monomer repräsentiert, zeigen auch nur einen sehr geringen dimeren Teil nach der gelelektrophoretischen Auftrennung.

### 3.2.3.2 Gelfiltration des rekombinanten, mutierten DsrC C100S Proteins

Die vereinigten Fraktionen der 50 bis 150 mM Imidazoleluate aus der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie des rekombinanten, mutierten DsrC C100S Proteins (Abb. 3.5), wurden nach der Dialyse und anschließenden Aufkonzentrierung auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen.

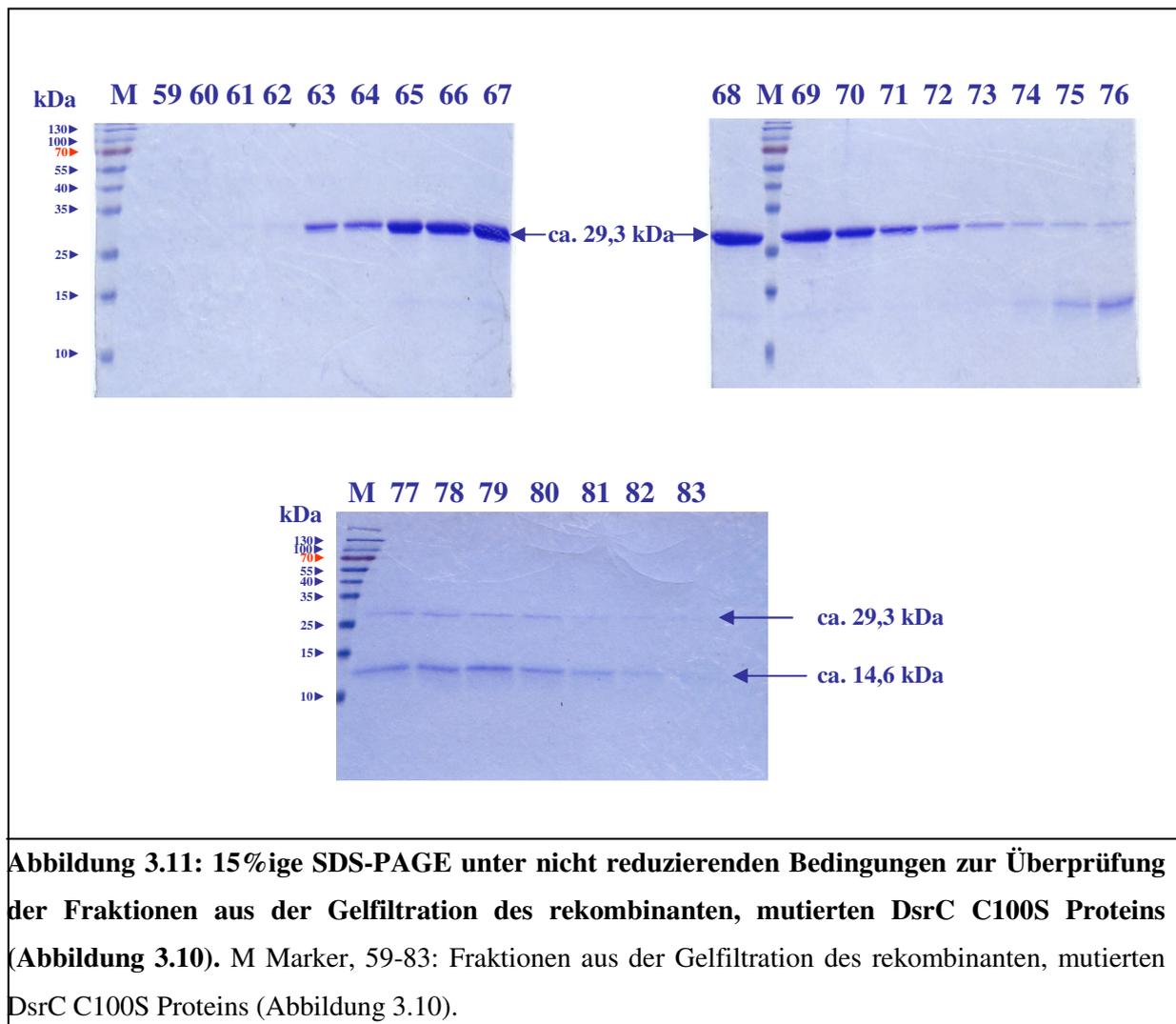


**Abbildung 3.10: Elutionsprofil der Gelfiltration des rekombinanten, mutierten DsrC**

**C100S Proteins.** Das dialysierte und auf 2 ml eingeeengte Eluat aus der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie, wurde auf eine Superdex<sup>TM75</sup> Säule gegeben und eluiert. —◆— :Extinktion relativ bei 280 nm.

Das Chromatogramm zeigt zwei Peaks. Der erste größere Peak, der sich über die Fraktionen 64 bis 70 erstreckt, repräsentiert das Dimer. Der zweite wesentlich kleinere Peak, der sich aus den Fraktionen 72 bis 80 zusammensetzt, repräsentiert das Monomer. Aliquots der Fraktionen, die sich über die beiden Peaks (siehe Abbildung 3.10) erstrecken, wurden einer nicht reduzierenden SDS-PAGE unterzogen (siehe Abb. 3.11). Die aufgetrennten Fraktionen 63 bis 73 zeigen eine gut ausgebildete Bande, die im Abgleich mit dem Chromatogramm

(siehe Abb. 3.10) der erwarteten Größe von ca. 29,3 kDa (Dimer) entspricht. Das meiste Protein befindet sich in den Fraktionen 65 bis 70, dieses Resultat liegt in Übereinstimmung mit dem Chromatogramm vor. Eine schwach ausgebildete Bande, die das Monomer mit einer Größe von ca. 14,6 kDa repräsentiert, befindet sich in den Fraktionen 74 bis 82, auch dies wieder in Übereinstimmung mit dem Chromatogramm.

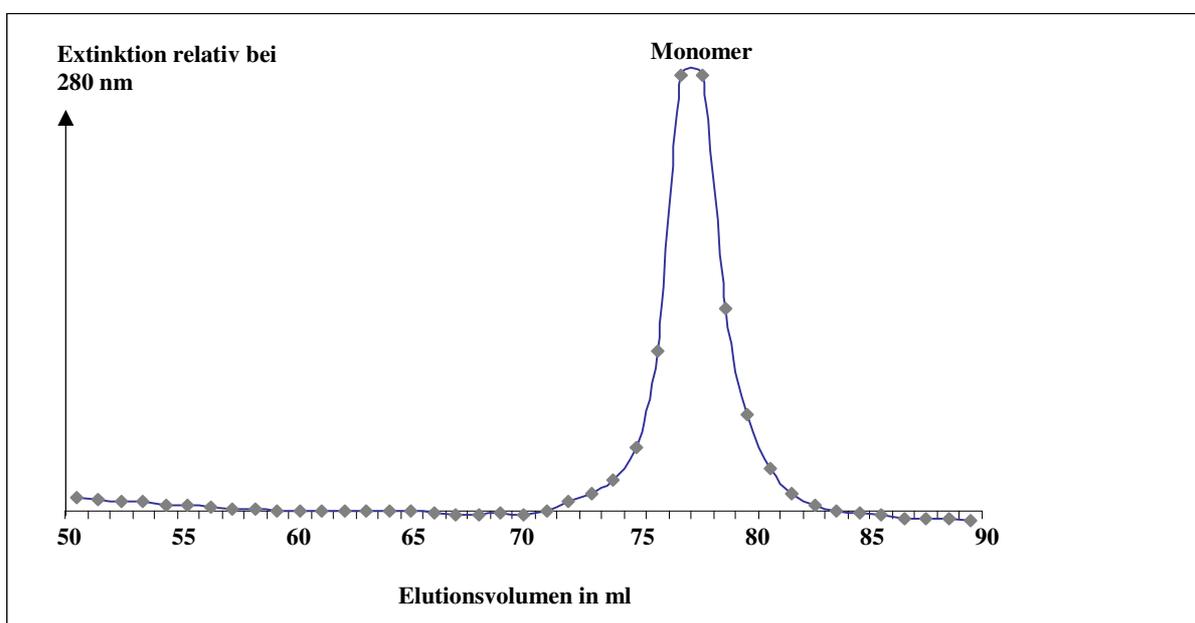


**Abbildung 3.11: 15%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen zur Überprüfung der Fraktionen aus der Gelfiltration des rekombinanten, mutierten DsrC C100S Proteins (Abbildung 3.10).** M Marker, 59-83: Fraktionen aus der Gelfiltration des rekombinanten, mutierten DsrC C100S Proteins (Abbildung 3.10).

Im Vergleich zur Gelfiltration des rekombinanten DsrC Proteins, liegt das mutierte DsrC C100S Protein nach der Gelfiltration fast ausschließlich in der dimeren Form vor. Dieses Ergebnis wurde sowohl mit dem Chromatogramm (Abbildung 3.10) als auch mit der dazugehörigen 15%igen SDS-PAGE (siehe Abb. 3.11) detektiert.

### 3.2.3.3 Gelfiltration des rekombinanten, mutierten DsrC C111S Proteins

Die vereinigten Imidazoleluate von 50 bis 150 mM aus der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie, die das DsrC C111S Protein enthielten, wurden nach Dialyse und Aufkonzentrierung, der unter Abbildung 3.12 dargestellten Gelfiltration unterzogen. Es wurde nur ein Peak eluiert, der sich über die Fraktionen 72 bis 83 erstreckt und dem Monomer mit einer Größe von ca. 14,6 kDa entspricht. Von den Fraktionen 70 bis 84 wurde jeweils ein Aliquot entnommen und über eine 15%ige SDS-PAGE analysiert.

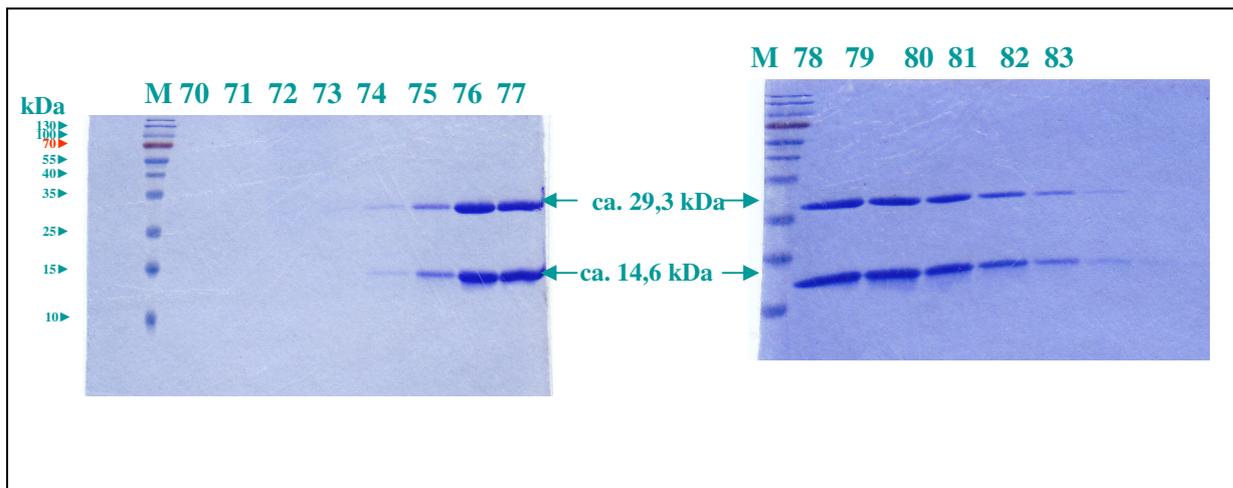


**Abbildung 3.12: Elutionsprofil der Gelfiltration des rekombinanten, mutierten**

**DsrC C111S Proteins.** Das dialysierte und auf 2 ml eingeeengte Eluat aus der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie, wurde auf eine Superdex<sup>TM75</sup> Säule gegeben und eluiert.

—◆— :Extinktion relativ bei 280 nm.

Im SDS-PAGE (siehe Abb. 3.13) liegt ein zum Chromatogramm (siehe Abb. 3.12) widersprüchliches Bild vor. In den Fraktionen 75 bis 83 befinden sich jeweils zwei Banden, eine die dem Monomer (ca. 14,6 kDa) des DsrC Proteins und eine die dem Dimer des DsrC Proteins (ca. 29,3 kDa) entspricht. Die Stärke der beiden Banden ist in etwa quantitativ gleich. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Vergleich zu den Chromatogrammen des DsrC Proteins und des mutierten DsrC C100S Proteins im Chromatogramm des DsrC C111S Proteins nur das Monomer detektiert wurde. Das Ergebnis des Chromatogramms wurde jedoch nicht durch das Ergebnis der SDS-PAGE bestätigt, da das DsrC C111S Protein im

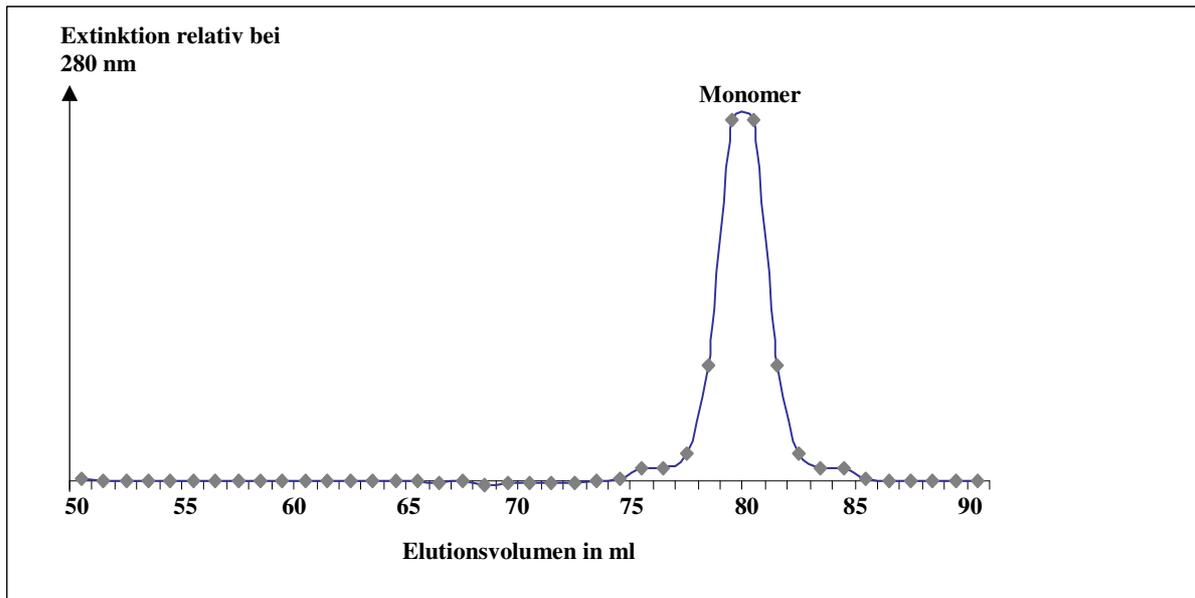


**Abbildung 3.13: 15%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen zur Überprüfung der Fraktionen aus der Gelfiltration des rekombinanten, mutierten DsrC C111S Proteins (Abbildung 3.12). M: Marker, 70-83: Fraktionen aus der Gelfiltration des rekombinanten mutierten DsrC C111S Proteins (Abbildung 3.12).**

SDS-Gel pro Fraktion sowohl in der monomeren als auch in der dimeren Form des DsrC Proteins vorliegt.

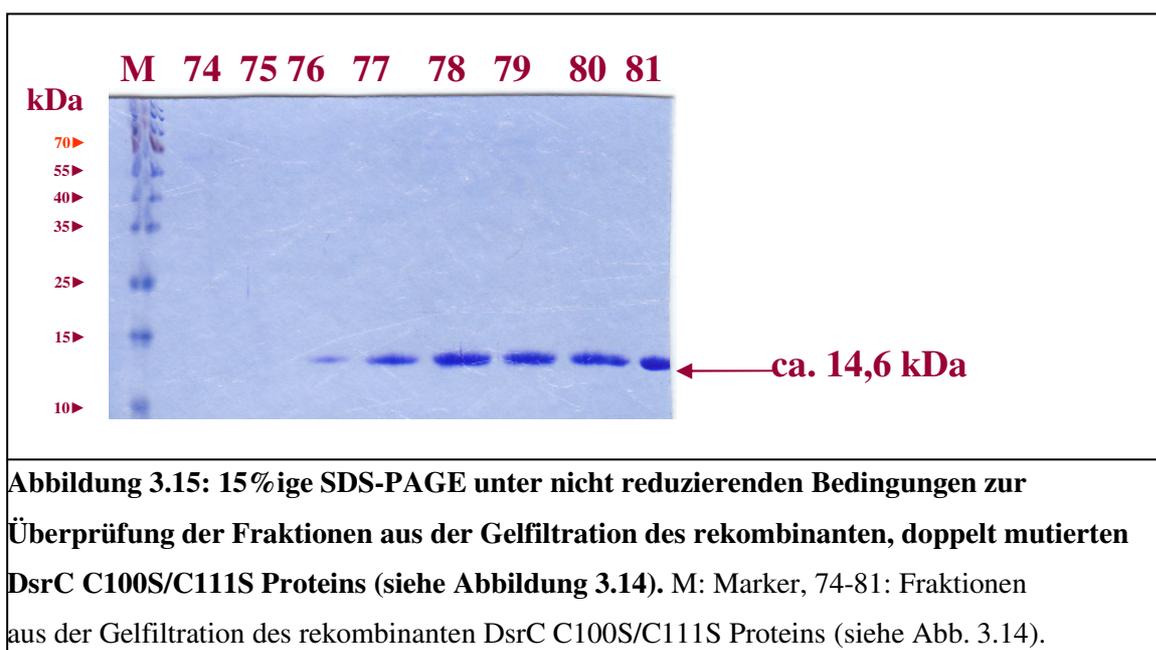
### 3.2.3.4 Gelfiltration des rekombinanten, mutierten DsrC C100S/C111S Proteins

Die vereinigten Imidazoleluate von 20 und 50 mM aus der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie, die das mutierte DsrC C100S/C111S Protein enthielten, wurden nach erfolgter Dialyse aufkonzentriert und mittels Gelfiltration aufgetrennt. Im Chromatogramm (siehe Abb. 3.14) ist ein großer Peak sichtbar, der sich über die Fraktionen 75 bis 85 erstreckt. Es konnte auf eine Molmasse von ca. 14,6 kDa geschlossen werden, die dem Monomer des DsrC Proteins entspricht. Zwecks weiterer Untersuchungen, wurde von den eluierten Fraktionen 74 bis 81 wie bei den vorhergehenden Versuchen wiederum ein Aliquot entnommen und über eine 15%ige SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abb. 3.15). Auch im SDS-Gel ist wiederum nur die monomere DsrC Form mit einer Größe von ca. 14,6 kDa detektierbar.



**Abbildung 3.14: Elutionsprofil der Gelfiltration des rekombinanten, mutierten DsrC C100S/C111S Proteins.** Das dialysierte und auf 2 ml eingeeengte Eluat aus der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie, wurde auf eine Superdex<sup>TM75</sup> Säule gegeben und eluiert.   
 —◆—: Extinktion relativ bei 280 nm.

Das Ergebnis bezüglich des Chromatogramms wird durch das Ergebnis der SDS-PAGE bestätigt. Für die Doppelmutante DsrC C100S/C111S wurde in beiden Untersuchungen jeweils nur das Monomer detektiert.



**Abbildung 3.15: 15%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen zur Überprüfung der Fraktionen aus der Gelfiltration des rekombinanten, doppelt mutierten DsrC C100S/C111S Proteins (siehe Abbildung 3.14).** M: Marker, 74-81: Fraktionen aus der Gelfiltration des rekombinanten DsrC C100S/C111S Proteins (siehe Abb. 3.14).

### 3.2.4 Verteilungen der monomeren und der dimeren Form der verschiedenen DsrC Proteine im SDS-Gel und in der Gelfiltration

	SDS-Gel Monomer	SDS-Gel Dimer	Gelfiltration Monomer	Gelfiltration Dimer
<b>DsrC</b>	<b>starke Bande</b>	<b>schwache Bande</b>	<b>1 kleinerer Peak</b>	<b>1 größerer Peak</b>
<b>DsrC C100S</b>	<b>ganz schwache Bande</b>	<b>starke Bande</b>	<b>ganz schwacher Peak</b>	<b>1 großer Peak</b>
<b>DsrC C111S</b>	<b>starke Bande</b>	<b>starke Bande</b>	<b>1 großer Peak</b>	■
<b>DsrC C100S/C111S</b>	<b>mittelstarke Bande</b>	■	<b>1 großer Peak</b>	■

**Tabelle 3.4: Übersicht über die Verteilung der monomeren und der dimeren Form der verschiedenen DsrC Proteine in den SDS-Gelen und bei der Gelfiltration.**

Die Tabelle 3.4 gibt eine kurze Zusammenfassung über die Verteilung der monomeren und der dimeren Form des rekombinanten DsrC Proteins sowie seiner mutierten Proteine wie sie nach durchgeführter Gelfiltration und SDS-PAGE vorlagen.

Die Tatsache, dass die Ergebnisse der SDS-PAGES, Unterschiede zu den Ergebnissen der Gelfiltration sowohl beim rekombinanten DsrC Protein als auch bei dem einfach mutierten DsrC C111S zeigen, wirft die Frage auf, ob es sich bei einigen, in den SDS-Gelen auftretenden Banden um Artefakte handeln kann. Zur Klärung dieser Frage wurden im Folgenden Untersuchungen mit dem Alkylierungsmittel Jodacetamid durchgeführt.

### **3.3 Untersuchungen des DsrC Proteins sowie seiner mutierten Proteine mittels Alkylierung durch Jodacetamid**

Freiliegende Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) der Cysteinseitenketten können miteinander Disulfidbrücken bilden, was unter Umständen eine Dimerisierung zur Folge haben kann. Um diese Fähigkeit der Sulfhydrylgruppen bei dem DsrC Protein sowie seinen mutierten Proteinen zu unterbinden, wurden die entsprechenden aufgereinigten und aufkonzentrierten Proteine mit dem Alkylierungsmittel Jodacetamid inkubiert. Die Sulfhydrylgruppen der Cysteine reagieren mit Jodacetamid zu stabilen S-Carboxymethylderivaten. Neben dem DsrC-S-Carboxymethylderivat entsteht bei dieser Reaktion auch Jodwasserstoff (siehe Kapitel:2.2.3.7). Diese kovalente Fixierung ist irreversibel, so dass weitere Reaktionen der alkylierten Sulfhydrylgruppen nicht möglich sind.

#### **3.3.1 Auswirkungen der Alkylierung auf das DsrC Protein sowie seine mutierten Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen**

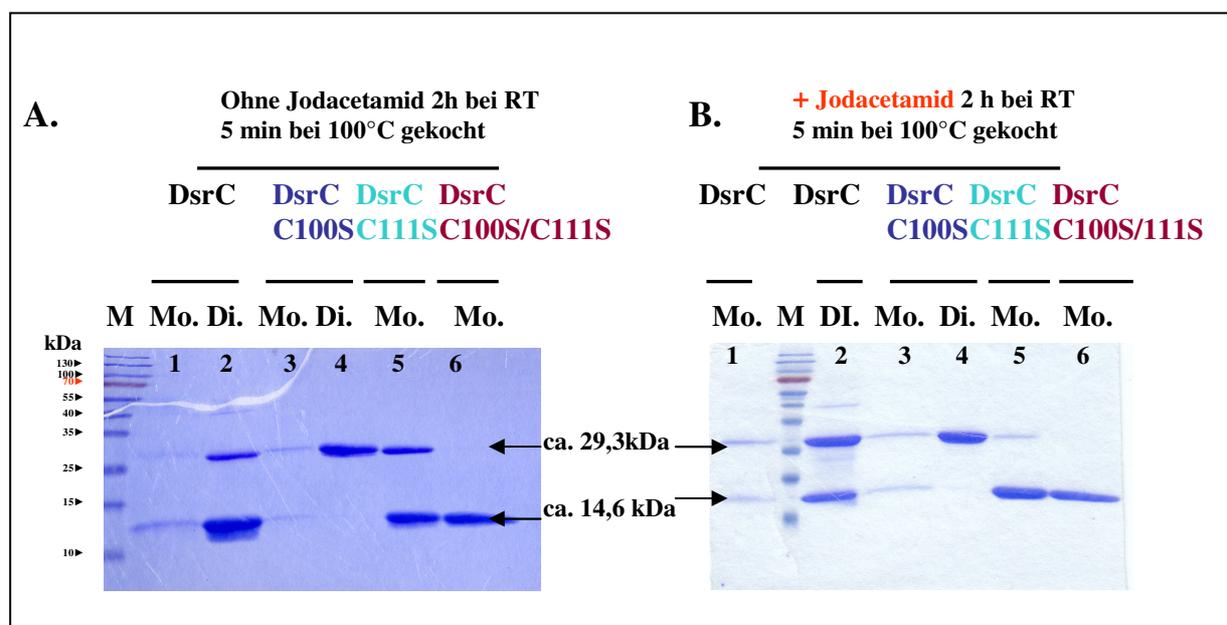
Inwieweit die Dimerisierung der verschiedenen DsrC Proteine in Folge einer Alkylierung beeinflusst wird, wurde in dieser Versuchsreihe untersucht. Die Nutzung verschiedener Temperaturen während der Inkubation sollte zudem klären, ob die Alkylierung temperaturabhängig ist. Zu diesem Zweck wurden mehrere identische Inkubationsansätze für zwei Stunden bei den Temperaturen 6°C, Raumtemperatur und 30°C angesetzt. Die zugefügte Endkonzentration des Jodacetamid betrug 10 mM.

In der ersten zur Alkylierung vorgestellten Versuchsreihe, dargestellt in der Abbildung 3.16, wurden die Proben der verschiedenen DsrC Proteine nach der zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur, mit nicht reduzierendem Probenpuffer versetzt, fünf Minuten bei 100°C gekocht und anschließend mittels SDS-PAGE (15%) analysiert.

Als Kontrolle für die Alkylierungsreaktion diente das doppelt mutierte DsrC C100S/C111S Protein. Es erscheint sowohl vor (Abb. 3.16, A: Spur 6) als auch nach der Alkylierung (Abb. 3.16, B: Spur 6) wie erwartet exklusiv als Monomer, da es in Folge fehlender Cysteine über keine Sulfhydrylgruppen verfügt. Dieses Ergebnis belegt somit gleichzeitig, dass die Alkylierungsreaktion keine für die Bandenbildung sichtbaren Nebeneffekte hat. Die beiden Einzelmutanten DsrC C100S und DsrC C111S zeigen in der SDS PAGE, unter nicht reduzierenden Bedingungen bezüglich ihrer Banden eine unterschiedliche Ausprägung. Das

rekombinante, mutierte DsrC C111S Protein, welches während der Chromatographie (siehe Abbildung 3.12) als Monomer eluiert wurde, liegt nach den SDS-PAGES (siehe Abbildung 3.13 und 3.16, A: Spur 5) sowohl in der monomeren als auch in der dimeren Form vor. Die Stärke der Banden, die die beiden Formen repräsentieren ist dabei annähernd gleich. Die Alkylierung des DsrC C111S Proteins führte zur ausschließlichen Bildung der monomeren Form in der Höhe von ca. 14,6 kDa (Abbildung 3.16, B: Spur 5). Das lässt darauf schließen, dass die Sulfhydrylgruppen vor der Alkylierung alle frei vorlagen.

Das DsrC C100S Protein eluierte während der Chromatographie zum hauptsächlichen Anteil als Dimer und nur zu einem geringen Anteil als Monomer (siehe Abb. 3.10). Proben der eluierten dimeren Form des DsrC C100S Proteins liegen ohne (Abb.3.16, A: Spur 4) und nach erfolgter Jodacetamid Behandlung komplett als Dimer vor (Abb.3.16, B: Spur 4).



**Abbildung 3.16: Analyse der bei Raumtemperatur alkylierten Proben der verschiedenen DsrC Proteine über eine 15%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen.**

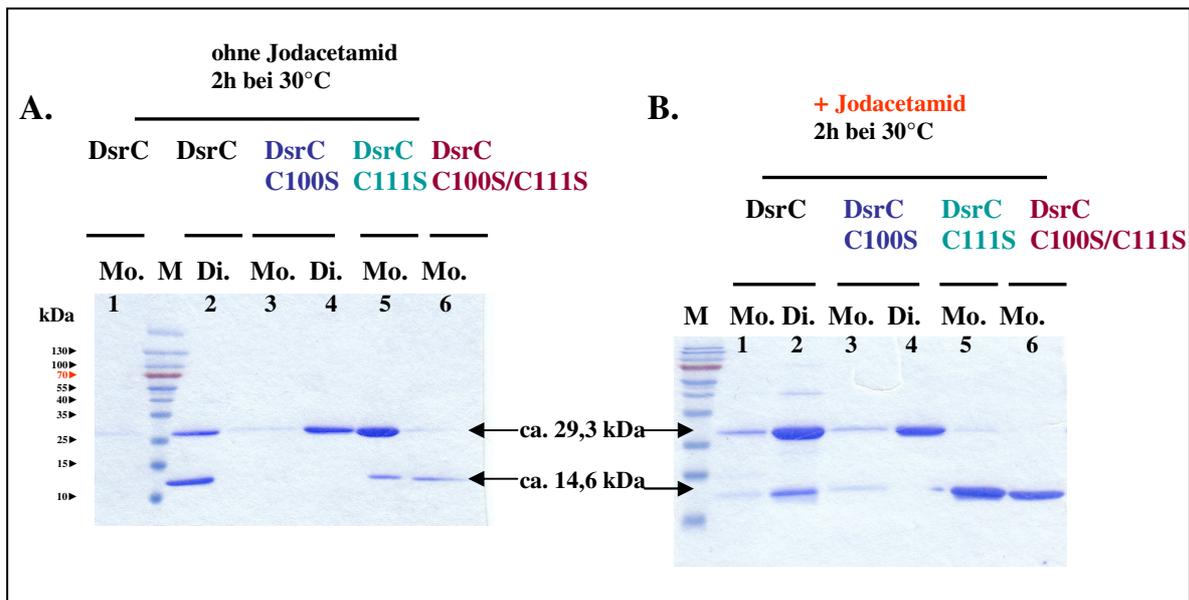
**A: ohne Alkylierung.** Proben der aufgereinigten, aufkonzentrierten DsrC Proteine wurden nach einer zweistündigen Inkubationszeit, bei Raumtemperatur ohne Zusatzmittel (wie im Methodenteil beschrieben), mit nicht reduzierendem Probenpuffer versetzt und fünf Minuten bei 100°C gekocht. Anschließend erfolgte die Auftrennung über eine 15%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen. **B: mit Alkylierung.** Die aufgereinigten und aufkonzentrierten Proben der DsrC Proteine wurden zunächst zwei Stunden mit Jodacetamid (Endkonzentration 10 mM) bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von nicht reduzierendem Probenpuffer. Die Auftrennung der Proben erfolgte nach einer fünfminütigen Kochzeit bei 100°C mit einer 15%igen SDS-PAGE. M: Marker; Mo: Monomer, Di: Dimer.

Dies spricht gegen das Vorhandensein noch frei verfügbarer Sulfhydrylgruppen vor der Alkylierung. Für das rekombinante, mutierte DsrC C100S Monomer (Abb. 3.16, A und B: Spuren 3) reichte die Proteinkonzentration nicht aus, um eine Aussage treffen zu können. Das aufkonzentrierte, rekombinante DsrC Dimer zeigt ohne Jodacetamid Behandlung eine stärkere Bande, die der monomeren Form entspricht und eine weniger ausgeprägte Bande, die der dimeren Form entspricht (Abb. 3.16, A: Spur 2). Nach der Alkylierung liegt eine stärker ausgeprägte Bande vor, die der dimeren Form entspricht, während die monomere Form in ihrer Ausprägung abgenommen hat (siehe Abb. 3.16, B: Spur 2). Für das rekombinante DsrC Monomer (Abb. 3.16, A und B: Spuren 1) ist die Proteinkonzentration zu gering, um eine vernünftige Einschätzung zu geben.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine Alkylierung der Doppelmutante DsrC C100S/C111S und der Einzelmutante DsrC C100S nicht zu einer Änderung des Bandenmusters im Vergleich mit den nicht alkylierten Proben führte. Dies lässt den Schluss zu, dass keine für eine Alkylierung frei liegende Sulfhydrylgruppe vorhanden war. Bei der DsrC C111S Mutante fand in Folge der Alkylierung eine komplette Auflösung der dimeren Bande statt, was dafür spricht, dass die Sulfhydrylgruppen alle frei vorlagen. Beim DsrC Dimer wurde ein Teil der Bande, die der monomeren Form entspricht zugunsten der dimeren Form aufgelöst.

Analog zur Vorgehensweise der Inkubation mit Jodacetamid bei Raumtemperatur, erfolgte die Inkubation der Proben bei 30°C (siehe Abb. 3.17). Ein anschließendes fünf Minuten langes Kochen der Proben bei 100°C entfiel.

In diesem Versuchsansatz zeigen die alkylierte Doppelmutante DsrC C100S/C111S (siehe Abb. 3.17, B: Spur 6), die wiederum die Kontrolle darstellt sowie die Mutanten DsrC C111S (siehe Abb. 3.17, B: Spur 5) und DsrC C100S Dimer (siehe Abb. 3.17, B: Spur 4) das gleiche Bandenmuster wie die entsprechenden alkylierten Proteine im vorhergehenden Versuch (siehe Abb. 3.16; B). Ein etwas abweichendes Muster findet sich beim alkylierten rekombinanten DsrC Dimer. Die ursprünglich monomere Form der Bande wurde fast vollständig zugunsten der dimeren Form aufgelöst (siehe Abb. 3.17, B: Spur 2).

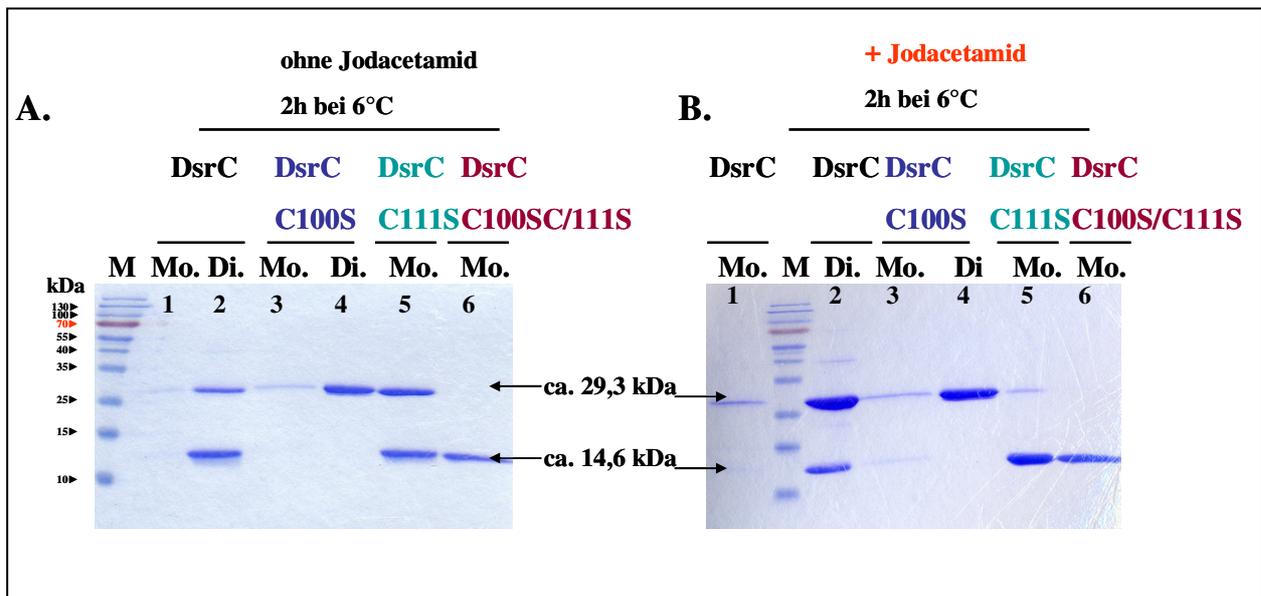


**Abbildung 3.17: Analyse der bei 30°C alkylierten Proben der verschiedenen DsrC Proteine über eine 15%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen.**

**A: ohne Alkylierung:** Proben der aufgereinigten, aufkonzentrierten DsrC Proteine wurden nach einer zweistündigen Inkubationszeit, bei 30°C ohne Zusatzmittel (wie im Methodenteil beschrieben), mit nicht reduzierendem Probenpuffer versetzt. Im Anschluss daran erfolgte die Auftrennung über eine 15%iges SDS-PAGE. **B: mit Alkylierung.** Die aufgereinigten und aufkonzentrierten Proben der DsrC Proteine wurden zunächst zwei Stunden mit Jodacetamid (Endkonzentration 10 mM) bei 30°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von nicht reduzierendem Probenpuffer und die anschließende Auftrennung der Proben über eine 15%iges SDS-PAGE. M: Marker; Mo: Monomer ; Di: Dimer

Die Versuchsreihe fand ihren Abschluss mit der Inkubation des rekombinanten DsrC Proteins sowie seiner Mutanten bei 6°C über einen Zeitraum von zwei Stunden sowie der folgenden Analyse mittels einer 15%igen, nicht reduzierenden SDS-PAGE ohne vorheriges Kochen der Proben.

Wie in Abbildung 3.18 dargestellt, führte die auf 6°C erniedrigte Temperatur während der Inkubation der Proben nicht zu Abweichungen bezüglich der Bandenbildung, im Vergleich zu den Proben in den beiden vorausgehenden Versuchsreihen. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Wahl der Temperatur die Effizienz der Alkylierung in keiner sichtbaren Weise beeinflusst.



**Abbildung 3.18:** Analyse der bei 6°C alkylierten Proben der verschiedenen DsrC Proteine über eine 15%ige SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen.

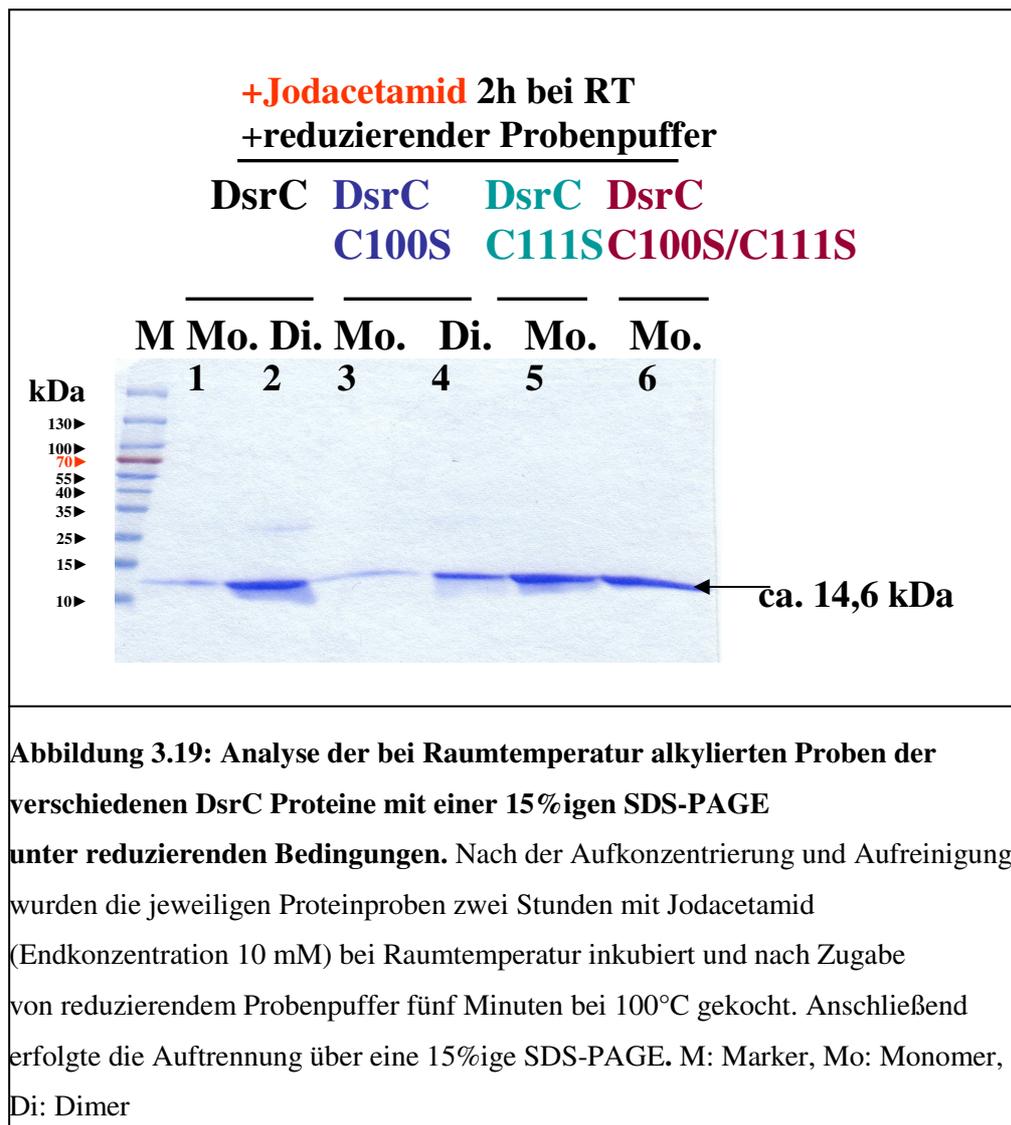
**A: ohne Alkylierung.** Die Proben der aufgereinigten, aufkonzentrierten DsrC Proteine, wurden nach einer zweistündigen Inkubationszeit bei 6°C ohne Zusatzmittel (wie im Methodenteil beschrieben) mit nicht reduzierendem Probenpuffer versetzt. Im Anschluss daran erfolgte die Auftrennung über eine 15%ige SDS-PAGE. **B: mit Alkylierung.** Die aufgereinigten und aufkonzentrierten Proben der DsrC Proteine wurden zunächst zwei Stunden mit Jodacetamid (Endkonzentration 10 mM) bei 6°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von nichtreduzierendem Probenpuffer und die anschließende Auftrennung der Proben über eine 15%ige SDS-PAGE. M: Marker; Mo: Monomer ; Di: Dimer

Weiterhin konnte die Alkylierung der verschiedenen DsrC Proteine nicht durch höhere Jodacetamidkonzentrationen verstärkt werden. Niedrigere Jodacetamidkonzentrationen reichten nicht aus, um vollständige Alkylierungen durchzuführen (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.2 Auswirkungen der Alkylierung auf das DsrC Protein sowie seine mutierten Proteine unter reduzierenden Bedingungen

Unter nicht reduzierenden Bedingungen treten wie in den vorherigen Versuchen mittels SDS-PAGES ermittelt, Dimere bei den verschiedenen DsrC Proteinen auf. Das Vorhandensein der für ihre Ausbildung erforderlichen und damit für weitere Reaktionen blockierten Sulfhydrylgruppen, wurde durch die Alkylierungsreaktionen bestätigt. Deshalb sollte im folgenden Versuch die Reduzierbarkeit der disulfidischen Formen durch ein Reduktionsmittel überprüft werden. Die Zugabe des reduzierenden Agens Mercaptoethanol im Probenpuffer

fürte wie in Abbildung 3.19 dargestellt, zum Verschwinden der Banden, die das Dimer repräsentieren, soweit sie bei den verschiedenen DsrC Proteinen überhaupt vorhanden sind. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die dimeren Formen, in der Abwesenheit eines reduzierenden Agens, auf die Disulfidbrückenbildung zwischen zwei monomeren DsrC Proteinen zurückzuführen sind, die bei Zugabe eines reduzierenden Agens wieder zu der monomeren DsrC Form regeneriert werden.



### **3.4 Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen dem DsrC Protein sowie seinen mutierten Proteinen mit dem rekombinanten DsrEFH Proteinkomplex**

Ausgangspunkt für die folgenden Interaktionsexperimente bilden die ersten von Schulte (2005) durchgeführten Inkubationsuntersuchungen bezüglich des Proteins DsrC und des DsrEFH Proteinkomplexes, in denen gezeigt werden konnte, dass nach einer gemeinsamen Inkubation dieser Proteine ein Bandshift gebildet wird. Ferner spricht die Tatsache der gemeinsamen Aufreinigung der Polypeptide DsrE, DsrF und DsrH als auch des DsrC Proteins, zusammen mit den Proteinen DsrAB und DsrK (Dahl et al., 2005), für mögliche Interaktionen. Zur näheren Charakterisierung dieses Bandshifts, wurden die Inkubationsexperimente zwischen DsrC und dem DsrEFH Proteinkomplex fortgesetzt. Ferner wurden die beiden neu generierten DsrC Einzelmutanten und die neu generierte DsrC Doppelmutante in diese Interaktionsexperimente mit einbezogen.

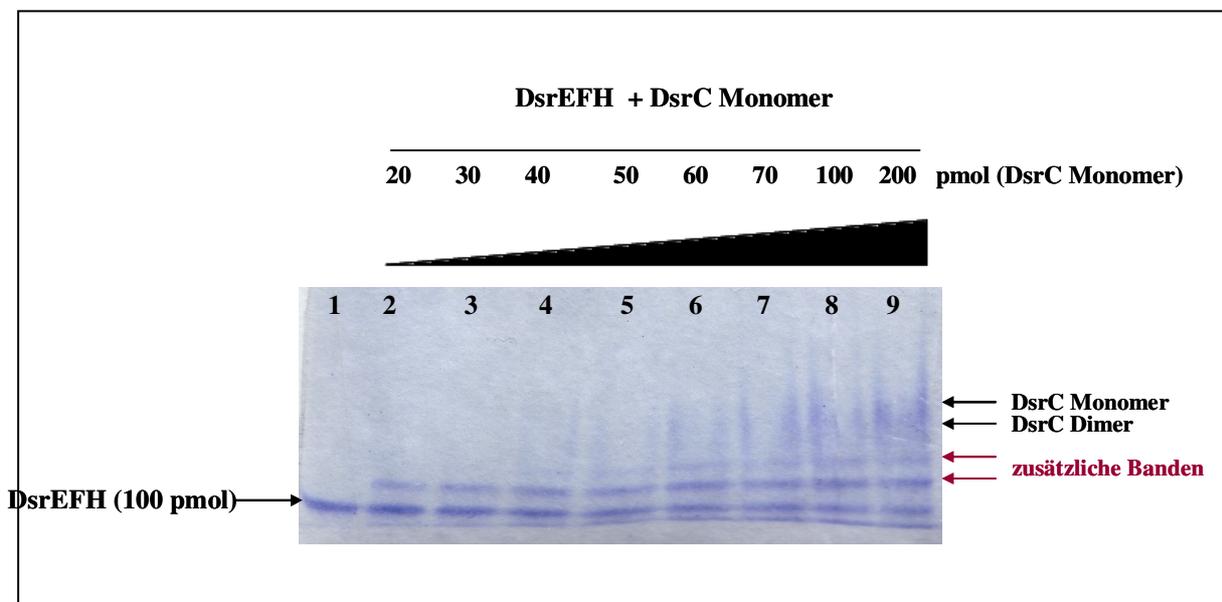
Zur Aufreinigung des DsrEFH Proteinkomplexes wurden ebenso wie bei der Aufreinigung des DsrC Proteins, die  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie als auch die Gelfiltration eingesetzt (Daten nicht gezeigt).

Die Versuchsreihe zu den möglichen Interaktionen lässt sich in drei Teile untergliedern:

- Der erste Teil umfasst eine Titrationsreihe zum DsrC Monomer sowie Untersuchungen zur Interaktion zwischen der monomeren und der dimeren Form des DsrC Proteins mit dem DsrEFH Proteinkomplex.
- Im zweiten Teil wurde der Einfluss einer durch das Reduktionsmittel TCEP hervorgerufenen Reduktion der Sulfhydrylgruppen auf die Interaktionsfähigkeit überprüft.
- Das diese Versuchsreihe abschließende Experiment, untersuchte die Interaktionsmöglichkeiten zwischen den beiden DsrC Einzelmutanten und der DsrC Doppelmutante mit dem DsrEFH Proteinkomplex.

### 3.4.1 Titrationsreihe des monomeren DsrC Proteins zur Interaktion mit dem DsrEFH Proteinkomplex

Im ersten Teil dieser Versuchsreihe sollte die optimal zu nutzende Proteinmenge, der monomeren Form des DsrC Proteins, zur Durchführung der Interaktionsuntersuchungen ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Titrationsreihe angelegt. Wie im Methodenteil (siehe Kap.2.2.3.8) beschrieben, wurde jeweils die konstante Proteinmenge von 100 pmol des rekombinanten DsrEFH Proteinkomplexes, mit steigenden Proteinmengen des rekombinanten DsrC Monomers, von 20 bis 200 pmol, miteinander bei Raumtemperatur für 45 Minuten inkubiert.



**Abb.: 3.20: Titrationsreihe zur Ermittlung der optimalen DsrC Proteinmenge für weiterführende Interaktionsuntersuchungen mit dem DsrEFH Proteinkomplex.**

**Die Analyse der Proben erfolgte über ein 7,5%iges natives Gel.**

DsrEFH (100 pmol) und DsrC Monomer (mit ansteigenden Proteinmengen von 20 - 200 pmol) wurden nach einer fünfundvierzigminütigen Inkubation bei Raumtemperatur mit Probenpuffer versetzt und auf ein 7,5%iges natives Gel aufgetragen. Spur 1: (Kontrolle) DsrEFH (100 pmol); Spuren 2 - 9: Die Proben, die in den Spuren 2 - 9 aufgetrennt wurden, enthalten je 100 pmol DsrEFH und ansteigende Proteinmengen des DsrC Monomer von 20 - 200 pmol. Die neuen zusätzlichen Banden sind mit roten Pfeilen markiert.

Die in der ersten Spur als Kontrolle aufgetragenen Polypeptide DsrE, DsrF und DsrH, die ein

Proteinheterohexamer bilden, laufen im nativen 7,5%igen Gel als eine einzige distinkte Bande (siehe Abb. 3.20: Spur 1).

Die beiden Banden, die in der 15%igen SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen in Höhe von ca. 14,6 kDa, die monomere und in Höhe von ca. 29,3 kDa, die dimere Form des DsrC Proteins repräsentieren, liegen im 7,5%igen nativen Gel als stark diffuse, nicht genau zu detektierende und verwischte Banden nahe beieinander. Dabei läuft die langsamere, dimere Form unterhalb der monomeren Form des DsrC Proteins (siehe Abbildung 3.20: Spur 9). Als eine Folge der Inkubation mit dem DsrEFH Proteinkomplex, wurde bereits ab einer DsrC Proteinmenge von 20 pmol, bis zur finalen Proteinmenge von 200 pmol, eine neue zusätzliche Bande, die langsamer läuft als die Bande, die den DsrEFH Proteinkomplex darstellt, gebildet (siehe Abb. 3.20: Spuren 2 bis 9). Die Erhöhung der Proteinmenge des monomeren DsrC Proteins führt ab einer Proteinmenge von 60 pmol nicht nur zur Ausbildung einer, sondern zweier neuer Banden (siehe Abb. 3.20: Spuren 6 bis 9). Ihre deutlichste Ausprägung erfahren diese beiden neuen Banden bei einer verwendeten DsrC Proteinmenge von 200 pmol (siehe Abb. 3.20: Spur: 9). Ein Vergleich mit der Kontrollprobe in der ersten Spur (Abb. 3.20), lässt erkennen, dass die Bande, die den DsrEFH Proteinkomplex repräsentiert, ab einer eingesetzten DsrC Proteinmenge von 40 pmol (siehe Abb. 3.20: Spuren 4 bis 9) schwächer ausgebildet ist als in der Kontrollprobe. Die geringste Ausbildung dieser Bande liegt bei einer DsrC Konzentration von 200 pmol vor.

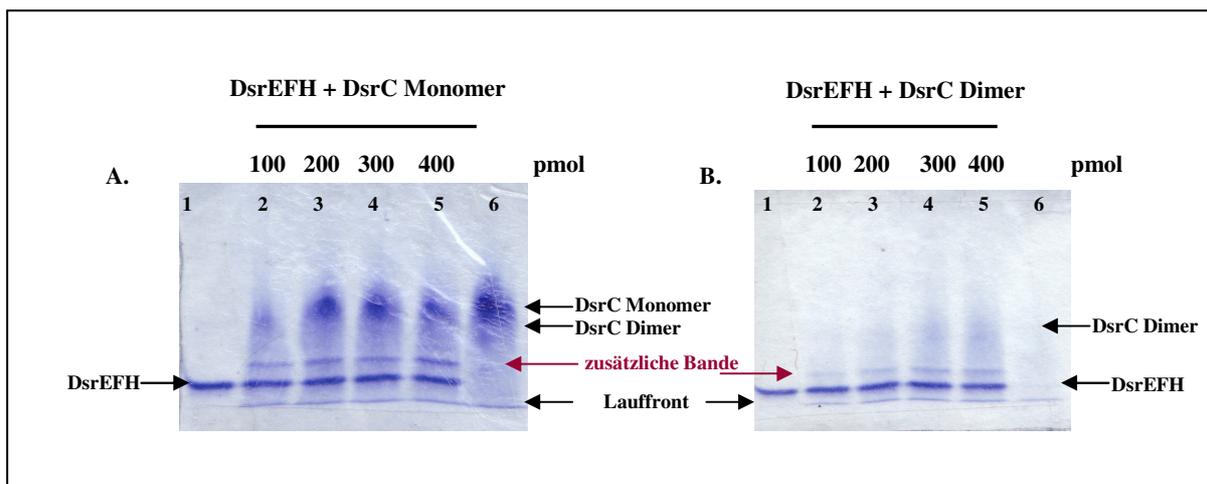
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der Erhöhung der Proteinmenge des monomeren DsrC Proteins eine stärkere Interaktion mit dem DsrEFH Proteinkomplex einhergeht, die sich ab einer Proteinmenge von 60 pmol in der Ausbildung nicht nur einer, sondern zweier neuer zusätzlicher Banden manifestiert. Gleichzeitig besteht eine Korrelation zwischen den beiden neu auftretenden Banden mit der Bande, die den DsrEFH Proteinkomplex darstellt. Diese Bande nimmt bei zunehmender Verstärkung der neuen Banden ab.

### **3.4.2 Gegenüberstellung der Wechselwirkungen der monomeren und der dimeren Form des DsrC Proteins mit dem DsrEFH Proteinkomplex**

Im zweiten Abschnitt des ersten Versuchsteiles erfolgte eine Gegenüberstellung, hinsichtlich der Fähigkeit des monomeren bzw. dimeren DsrC Proteins, mit dem DsrEFH Proteinkomplex zu interagieren. Es wurden jeweils 100 pmol des rekombinanten DsrEFH Proteinkomplexes

mit steigenden Proteinmengen (100 bis 400 pmol) des rekombinanten DsrC Monomers sowie des DsrC Dimers, mit dem entsprechenden Inkubationspuffer fünfundsiebzehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die 7,5%igen nativen Gele, die der Analyse der Proben dienen, sind in der Abbildung 3.21 unter A und B dargestellt.

Durch eine Probe des DsrEFH Proteinkomplexes in der jeweils ersten Spur sowie eine Probe des DsrC Monomers bzw. DsrC Dimers in der jeweils sechsten Spur (siehe Abb. 3.21), werden die beiden Kontrollen repräsentiert.



**Abbildung 3.21: Vergleich der Interaktion zwischen rekombinantem DsrEFH Proteinkomplex mit rekombinantem DsrC Monomer sowie rekombinantem DsrC Dimer. Die Analyse der Proben erfolgte über ein 7,5%iges natives Gel.**

**A.:** DsrEFH (100 pmol) und DsrC Monomer (mit Proteinmengen von 100 - 400 pmol), wurden nach einer fünfundsiebzehnjährigen Inkubation mit Inkubationspuffer bei Raumtemperatur mit Probenpuffer versetzt und über ein 7,5%iges natives Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Spur 1: (Kontrolle) DsrEFH (100 pmol); Spuren 2 - 5: DsrEFH (100 pmol) + DsrC Monomer (mit steigenden Proteinmengen von 200 - 400 pmol); Spur 6: (Kontrolle) DsrC Monomer (400 pmol);

**B.:** DsrEFH (100 pmol) und DsrC Dimer (mit Proteinmengen von 100 - 400 pmol), wurden im Anschluss an eine fünfundsiebzehnjährige Inkubation mit Inkubationspuffer bei Raumtemperatur über ein 7,5%iges natives Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Spur 1: (Kontrolle) DsrEFH (100 pmol); Spuren 2 - 5: DsrEFH (100 pmol) + DsrC Dimer (mit steigenden Proteinmengen von 200 - 400 pmol); Spur 6 (Kontrolle): DsrC Dimer (200 pmol).

Bei der Verwendung der monomeren DsrC Form (siehe Abb. 3.21 unter A), wurde erwartungsgemäß und wie bereits im vorherigen Experiment detektiert, eine neue zusätzliche Bande gebildet. Eine zweite zusätzliche Bande wie im vorherigen Versuch (siehe Abb. 3.20) ist jedoch nicht detektierbar.

Auch bei Verwendung der dimeren DsrC Form (siehe Abb.3.20 unter B), wurde als eine Folge der Inkubationen mit dem DsrEFH Proteinkomplex eine neue, zusätzliche kurz oberhalb von DsrEFH laufende Bande gebildet (siehe Abbildung 3.21 B: Spuren 2 bis 5). Die Gegenüberstellung der Ergebnisse bei Verwendung der monomeren und der dimeren Form des DsrC Proteins zeigt, dass die monomere Form des DsrC Proteins zu einer erhöhten Interaktionsfähigkeit mit dem DsrEFH Proteinkomplex führt, erkennbar an der stärker ausgeprägten, zusätzlichen Bande. Eine erhöhte Intensität der zusätzlichen Bande sowohl bei Verwendung der monomeren als auch bei Verwendung der dimeren Form, ist ab einer DsrC Proteinmenge von 200 pmol zu beobachten, bleibt jedoch konstant bis zu der Proteinmenge von 400 pmol.

Eine Versuchsanordnung (deren Daten hier nicht gezeigt werden), innerhalb derer sowohl rekombinantes DsrEFH als auch rekombinantes DsrC Monomer miteinander inkubiert wurden, die zuvor unter reduzierenden Bedingungen aufgereinigt wurden (TCEP Endkonzentration 1 mM), führte auch zur Ausbildung einer zusätzlichen schwach ausgebildeten Bande. Eine Erhöhung der Konzentration des rekombinanten DsrC Monomers führte jedoch nicht zu einer Zunahme hinsichtlich der Stärke der neuen Bande.

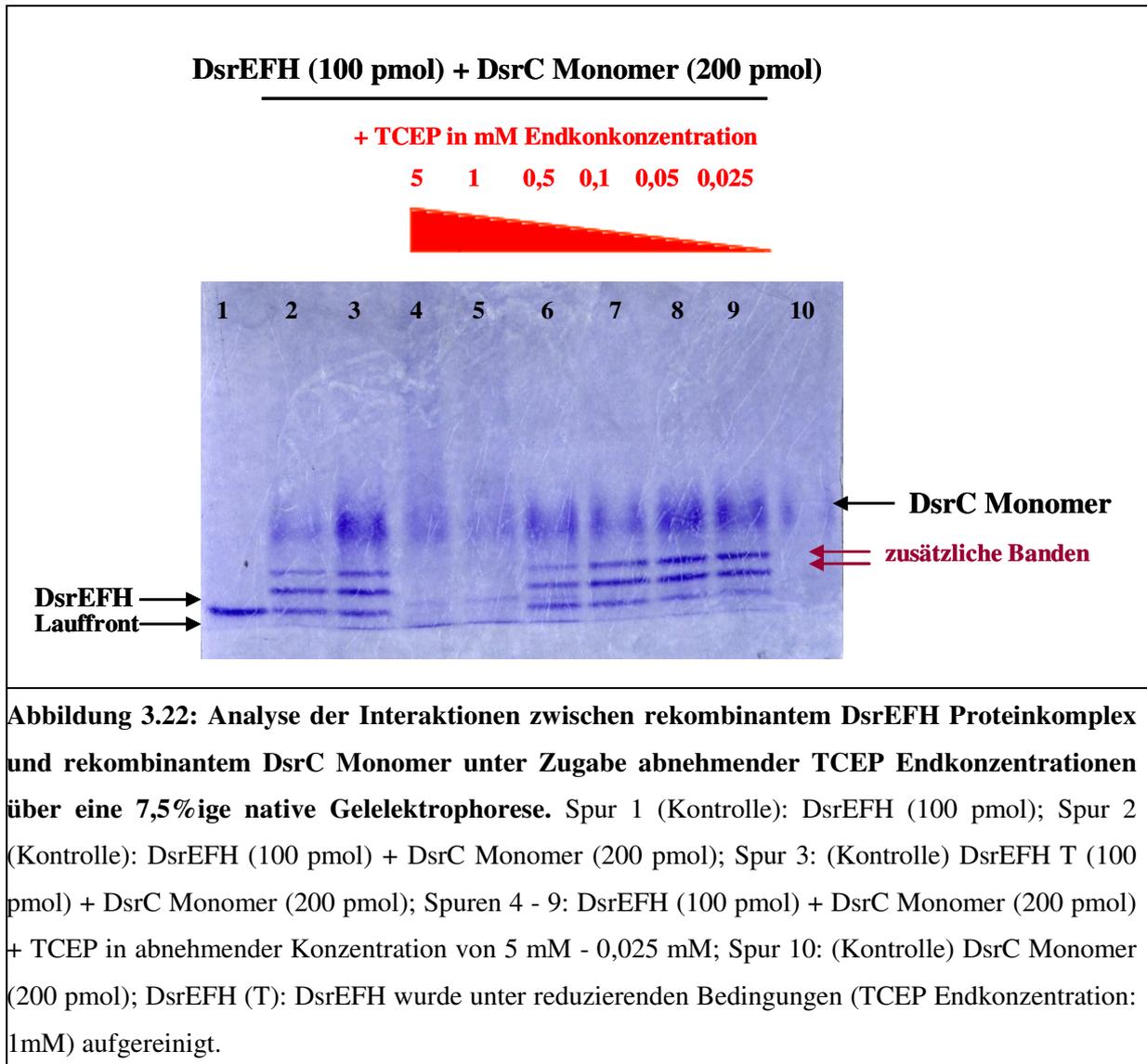
### **3.4.3 Optimierung der Wechselwirkungen zwischen DsrEFH Proteinkomplex und DsrC Monomer durch zusätzliche Gabe von TCEP**

Im zweiten Teil der Interaktionsuntersuchungen sollte geklärt werden, inwieweit die Interaktionsfähigkeit des DsrC Monomers mit dem DsrEFH Proteinkomplex, die unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgereinigt wurden, durch den Zusatz eines Reduktionsmittels gefördert werden kann. Für die zusätzliche Reduktion der Sulfhydrylgruppen wurde TCEP als Reduktionsmittel gewählt. Die Wahl fiel deshalb auf TCEP [Tris(2-carboxyethyl) phosphine] als Reduktionsmittel, an Stelle von DTT [Dithiothreitol], da TCEP wesentlich stabiler ist als DTT, wenn ein Protein über einen längeren Zeitraum gelagert wird (Getz et al., 1999).

Die zugehörigen Ergebnisse repräsentiert die Abbildung 3.22.

Wie in den vorangegangenen Versuchen wurde für den DsrEFH Proteinkomplex wiederum eine Proteinmenge in Höhe von 100 pmol eingesetzt. Rekombinantes DsrC Monomer wurde aufgrund der Ergebnisse aus der Titrationsreihe (siehe Kap. 3.4.1) und des sich

anschließenden Versuches, dargestellt unter Kapitel 3.4.2, in einer Menge von 200 pmol eingesetzt.



Für die Auswertung wurden insgesamt vier Kontrollen herangezogen (siehe Abb. 3.22: Spuren 1, 2, 3 und 10). Das DsrC Monomer und der DsrEFH Proteinkomplex wurden, mit dem entsprechenden Inkubationspuffer und zusätzlich zugefügtem TCEP in Endkonzentrationen von 5 bis 0,025 mM, für fünfundvierzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die höheren TCEP Endkonzentrationen von 5 und 1 mM führten zur Zerstörung der Proteine, erkennbar an den schattenförmigen Schlieren innerhalb der Spuren vier und fünf in der Abbildung 3.22. TCEP Endkonzentrationen von 0,5 bis 0,025 mM innerhalb der Inkubationsansätze, begünstigten die Ausbildung zweier neuer Banden (siehe Abb. 3.22:

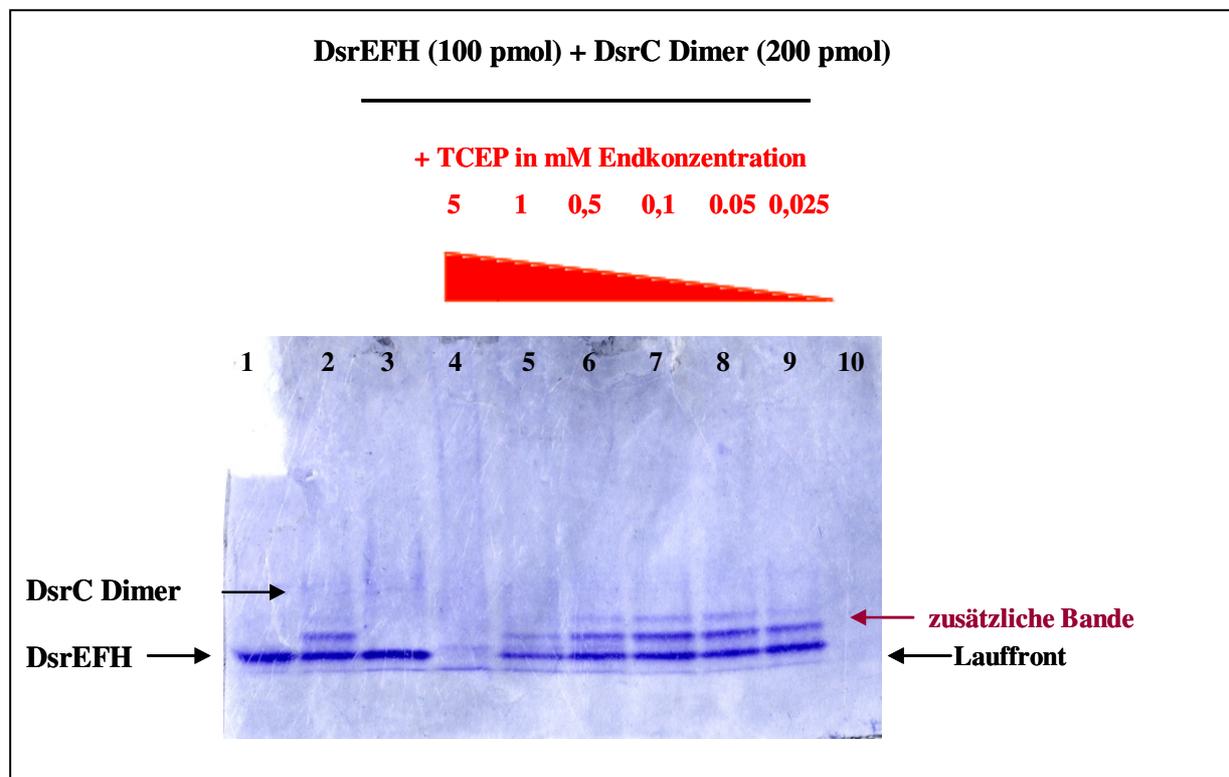
Spuren 6 bis 9). Bei abnehmender TCEP Endkonzentration zeigen diese neuen Banden eine zunehmende Intensität. Eine TCEP Endkonzentration zwischen 0,05 und 0,025 mM führte zu der bisher stärksten zu detektierenden Interaktion zwischen rekombinantem DsrEFH Proteinkomplex und rekombinantem DsrC Monomer, die sich in der Ausbildung zweier gleichstarker Banden manifestiert (siehe Abb. 3.22: Spuren 8 und 9). In ihrer Ausprägung sind die Banden mit der Bande gleichzusetzen, die den ursprünglichen DsrEFH Proteinkomplex repräsentiert (Abb. 3.22: Spur 1). Diese ursprüngliche Bande wurde bei Verwendung der TCEP Endkonzentrationen von 0,05-0,025 mM fast gänzlich aufgelöst (siehe Abb. 3.22: Spuren 8 und 9).

Insgesamt ist ein deutlich abhängiger Effekt der Interaktionsfähigkeit der Proteine vom Reduktionsstatus detektierbar. Die Verwendung von TCEP begünstigte mit abnehmender Konzentration die Interaktion zwischen dem DsrEFH Proteinkomplex und der monomeren Form des DsrC Proteins, erkennbar an der Auflösung der ursprünglichen Bande, die den DsrEFH Proteinkomplex repräsentiert.

#### **3.4.4 Optimierung der Wechselwirkungen zwischen DsrEFH Proteinkomplex und DsrC Dimer bei zusätzlicher Gabe von TCEP**

In der Versuchsreihe unter 3.4.2 konnte gezeigt werden, dass die Interaktionsfähigkeit der dimeren Form des DsrC Proteins mit dem DsrEFH Proteinkomplex schwächer ist als es für die entsprechende monomere Form des DsrC Proteins gezeigt werden konnte (siehe Abb. 3.21 unter A und B). Die Alkylierungsversuche (siehe Kap. 3.3), ebenso wie der Lauf der verschiedenen DsrC Proteine unter reduzierenden Bedingungen (siehe Abb. 3.19), bestätigten die Sulfhydrylgruppen als ursächlich für die Dimerisierung. Aufgrund dieser vorhergehenden Ergebnisse sollte die Möglichkeit untersucht werden, inwieweit das Reduktionsmittel TCEP in der Lage ist, die dimere Form des DsrC Proteins soweit zu der monomeren Form zu reduzieren, so dass eine ähnlich starke Interaktion mit dem DsrEFH Proteinkomplex zu erreichen ist. Für die folgende Interaktionsuntersuchung, mit der dimeren DsrC Form des DsrC Proteins, wurde die Versuchsanordnung des vorherigen Experimentes (siehe Kap. 3.4.3) unverändert übernommen.

Die unter Abbildung 3.23 im nativen Gel dargestellten Ergebnisse wurden, wiederum unter Einbeziehung von vier Kontrollen, ausgewertet. In der ersten Spur läuft als Kontrolle die distinkte Bande, die den rekombinanten DsrEFH Proteinkomplex repräsentiert.



**Abbildung 3.23: Analyse der Interaktion zwischen rekombinantem DsrEFH Proteinkomplex und rekombinantem DsrC Dimer bei abnehmenden TCEP Endkonzentrationen über eine 7,5%ige native Gelelektrophorese** Spur 1: (Kontrolle) DsrEFH (100 pmol); Spur 2: (Kontrolle) DsrEFH (T) (100 pmol) + DsrC Dimer (200 pmol); Spur 3: (Kontrolle) DsrEFH (100 pmol) + DsrC Dimer (200 pmol); Spuren 4 - 9: DsrEFH (100 pmol) + DsrC Dimer (200 pmol) + TCEP in abnehmenden Endkonzentrationen von 5 mM bis 0,025 mM; Spur 10: (Kontrolle) DsrC (200 pmol).

Das als Kontrolle in Spur zehn aufgetragene rekombinante DsrC Dimer ist nicht erkennbar. Inkubationsproben, der Proteine mit abnehmenden TCEP Endkonzentrationen von 5 bis 0,025 mM, wurden innerhalb der Spuren vier bis neun aufgetrennt. Im Gegensatz zur verwendeten monomeren DsrC Form (siehe Abb. 3.22), führte nur die TCEP Endkonzentration von 5 mM zur Zerstörung der Proteine (siehe Abb. 3.23: Spur 4). Abnehmende TCEP Endkonzentrationen von 0,5 bis 0,025 mM innerhalb der Proben in den Spuren sechs bis neun, bedingten die Ausbildung einer neuen prominenten zusätzlichen Bande. Eine zweite zusätzliche Bande wie sie bei Verwendung des DsrC Monomers gebildet wurde, ist nur bei TCEP Endkonzentrationen von 0,5 bis 0,05 mM sehr schwach erkennbar. Eine vergleichbare Zunahme der Bandenstärke dieser beiden neuen zusätzlichen Banden, bei abnehmender TCEP

Endkonzentration wie bei der Verwendung des DsrC Monomer, liegt nicht vor. Eine Veränderung der Bande, die den rekombinanten DsrEFH Proteinkomplex darstellt, kann ebenfalls nicht bestätigt werden.

Die Ergebnisse wie sie bei Verwendung der monomeren DsrC Form erzielt wurden, konnten mit der dimeren Form des DsrC Proteins unter gleichen Bedingungen nicht reproduziert werden. Dies bestätigt zum einen die Ergebnisse aus dem Versuch in Kapitel 3.4.2 (siehe Abbildung 3.21). Zwar wurde durch die zusätzlichen Gaben von TCEP erreicht, dass die neue Bande prominenter wurde, eine noch stärkere Interaktion konnte jedoch durch das TCEP nicht induziert werden. Die Möglichkeiten der Variation der TCEP Endkonzentration wurden aber in dem Bereich zwischen 0,1 und 0,05 mM noch nicht ausgeschöpft.

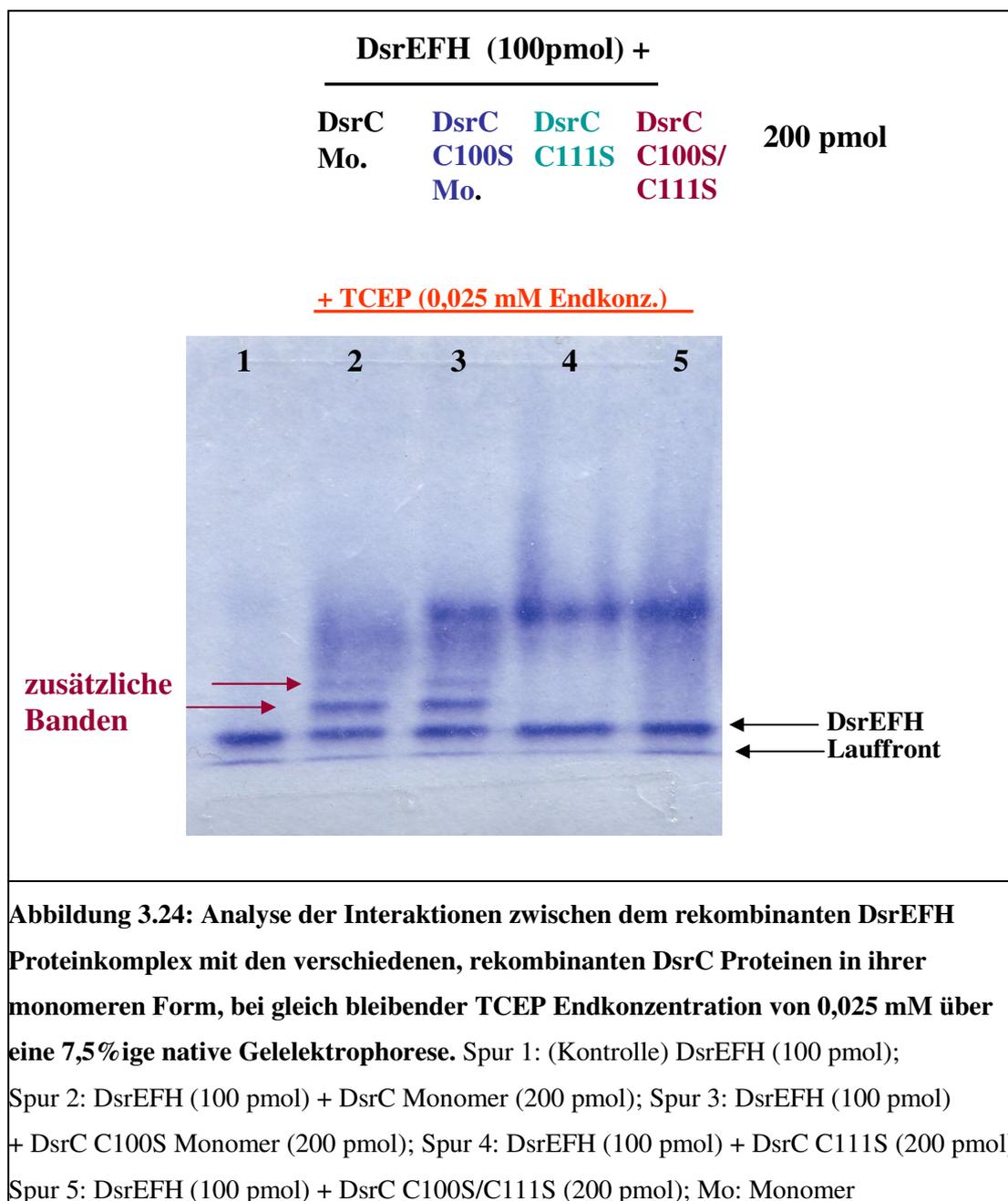
Auf der anderen Seite konnte deutlich gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen der monomeren DsrC Form und dem DsrEFH Proteinkomplex stattfindet, und dass es möglich ist durch optimale Reduktionsbedingungen diese Interaktion zu fördern.

### **3.4.5 Wechselwirkungen der mutierten Formen DsrC C100S Monomer, DsrC C111S und DsrC C100S/C111S mit dem DsrEFH Proteinkomplex**

Eine abschließende Versuchsreihe sollte letztendlich klären, ob und inwieweit die rekombinanten, mutierten, monomeren Formen der verschiedenen DsrC Proteine in der Lage sind, mit dem rekombinanten DsrEFH Proteinkomplex zu interagieren. Damit sollte gleichzeitig die Möglichkeit eröffnet werden, das Cystein zu identifizieren, welches letztendlich für die Interaktion verantwortlich ist. Neben der Einzelmutante DsrC C111S und der Doppelmutante DsrC C100S/C111S, wurden die monomeren Formen des rekombinanten DsrC Proteins sowie der Einzelmutante DsrC C100S eingesetzt. Dabei belief sich die jeweilige Konzentration der verschiedenen DsrC Proteine auf 200 pmol und des rekombinanten DsrEFH Proteinkomplexes auf 100 pmol. Da zusätzliches TCEP, in einer Endkonzentration von 0,025 mM, die Interaktion zwischen der monomeren Form des DsrC Proteins und dem DsrEFH Proteinkomplex optimal förderte (siehe Abb. 3.22), wurde diese TCEP Endkonzentration auch in den abschließenden Inkubationsansätzen eingesetzt. Die Bedingungen entsprachen denen aus den beiden vorhergehenden Versuchen.

Weder eine Inkubation des DsrEFH Proteinkomplexes mit der Einzelmutante DsrC C111S noch mit der Doppelmutante DsrC C100S/C111S (siehe Abb. 3.24: Spuren vier und fünf),

fürte zu einer Interaktion, was an der Ausbildung neuer zusätzlicher Banden erkennbar wäre. Weiterhin liegt die Bande, die den DsrEFH Proteinkomplex darstellt, beim Vergleich mit der Kontrollprobe in der ersten Spur (siehe Abb. 3.24), nach den Inkubationsversuchen mit diesen beiden mutierten Formen unverändert vor. Auch andere sichtbare Veränderungen sind nicht wahrnehmbar. Hingegen zeigt die monomere Form der DsrC C100S Einzelmutante eine mit



dem monomeren DsrC Protein vergleichbare Interaktion mit dem DsrEFH Proteinkomplex. Bei beiden ist eine zusätzliche prominente Bande ausgebildet. Eine zweite zusätzliche Bande ist bei beiden Proteinen ähnlich schwach ausgebildet. Eine geringfügige Abnahme der Bande,

die den DsrEFH Proteinkomplex darstellt, ist erkennbar. Die Interaktionsstärke ist vergleichbar mit den Proben, die nach der Inkubation der Proteine ohne zusätzliche Gabe des TCEP vorliegen (siehe Abb. 3.20: Spur 9 und Abb. 3.22: Spur 3).

Mit dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion des DsrEFH Proteinkomplexes nur mit der monomeren Form des rekombinanten DsrC Proteins sowie der monomeren Form des mutierten DsrC C100S Proteins stattfindet. Eine Interaktion zwischen dem DsrEFH Proteinkomplex und den mutierten Proteinen DsrC C111S und DsrC C100S/C111S ist auszuschliessen.

## 4 Diskussion

Das cytoplasmatische DsrC Protein und der ebenso cytoplasmatisch lokalisierte DsrEFH Proteinkomplex, des Schwefel oxidierenden Bakteriums *Allochromatium vinosum*, sind Gegenstand dieser Arbeit.

Das DsrC Protein findet sich sowohl in Schwefelverbindungen oxidierenden und (als auch in Sulfat) reduzierenden Bakterien. Gemeinsam ist diesen Bakterien, dass sie auch die *dsrAB* Gene besitzen, welche für die dissimilatorische Sulfitreduktase kodieren (Sander et al., 2006). Ausgangs- und Ansatzpunkt für die Untersuchungen in dieser Arbeit sind die beiden konservierten Cysteinreste Cys100 und Cys111 am C-Terminus des DsrC Proteins. Das Cys100 liegt zwischen dem Ende der  $\alpha_5$ -Helix und dem Anfang der  $\beta$ -Haarnadelstruktur (Cort et al., 2008). Bakterien, die wie *Allochromatium vinosum*, eine dissimilatorische Sulfitreduktase (siehe auch Kap. 1.5) besitzen, weisen auch dieses konservierte Cys100 innerhalb ihrer DsrC Sequenz auf. Diese Präsenz des Cys100, auch in anderen Schwefel oxidierenden Bakterien, ist ein Hinweis für seine Bedeutung (Cort et al., 2008). Bakterien ohne dissimilatorische Sulfitreduktase wie *Escherichia coli* und einige andere Gammaproteobakterien, fehlt das konservierte Cys100 (Sander et al., 2006; Cort et al., 2008). Das Cys111 liegt C-terminal als vorletzte Aminosäure am Ende der  $\beta$ -Haarnadel (Cort et al., 2008). Interessant ist die  $\beta$ -Haarnadelstruktur als Ganzes. Sie wurde auch innerhalb des DsrC Proteins aus *Pyrobaculum aerophilum* nachgewiesen (Cort et al., 2001). Durch die Strukturaufklärung des DsrC Proteins aus *Allochromatium vinosum*, die mittels NMR-Spektroskopie unter nicht reduzierenden Bedingungen ermittelt wurde, konnte man Einblick darin erlangen, dass diese  $\beta$ -Haarnadel, auch als „unstrukturierter Arm“ bezeichnet, flexibel ist (Cort et al., 2008). Dieselbe setzt sich aus den letzten 11 Aminosäureresten mit der Sequenzfolge FAGLPKPTGCV zusammen, von denen 7 mit der Sequenzfolge PKPTGCV bei allen Schwefel oxidierenden Organismen hoch konserviert sind (Schulte, 2005). Rekombinantes DsrC bildet, wenn es unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgereinigt wird, zwei Konformationszustände, das Monomer und das Dimer (Schulte, 2005). Durch die Anwendung reduzierender Agenzien wurde bestätigt, dass die Dimerbildung zwischen zwei rekombinanten DsrC Proteinen auf eine kovalente Disulfidbrücke zurückzuführen ist (Schulte, 2005).

Die Polypeptide DsrE, DsrF und DsrH, die zusammen ein Proteinheterohexamer der Struktur  $\alpha_2\beta_2\gamma_2$  bilden (Dahl et al., 2007), sind spezifisch für Schwefel oxidierende Bakterien, die auch wiederum die dissimilatorische Sulfitreduktase (DsrAB) enthalten (Sander et al., 2006). In

Sulfat reduzierenden Bakterien sind die Polypeptide DsrE, DsrF und DsrH nicht zu finden (Mussmann et al., 2005; Sander et al., 2006; Grimm et al., 2008). Disulfid reduzierende und SH-Gruppen alkylierende Agenzien zeigten, dass die drei Polypeptide DsrE, DsrF und DsrH nicht über kovalente Disulfidbrücken verbunden sind (Schulte, 2005).

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, zu ermitteln, welcher der beiden Cysteinreste Cys100 und Cys111 an der Dimerbildung zwischen zwei rekombinanten DsrC Proteinen beteiligt ist, und ob an Hand dessen etwas über die eigentliche Funktion des DsrC Proteins ausgesagt werden kann.

Ferner sollte eine genauere Klärung der möglichen Interaktionen zwischen dem rekombinanten DsrC Protein und dem rekombinanten DsrEFH Proteinkomplex erfolgen. In diesen Experimenten zur Interaktion wurden auch die in dieser Arbeit generierten, mutierten, rekombinanten Proteine DsrC C100S, DsrC C111S und DsrC C100S/C111S einbezogen.

#### **4.1 Die Generierung der drei Konstrukte pET15b dsrC C100, pET15b dsrC C111 und pET15b dsrC C100/C111**

Das primäre Teilziel dieser Arbeit bestand in der Generierung der mutierten, rekombinanten Substitutionskonstrukte pET15b dsrC C100, pET15b dsrC C111 und pET15b dsrC C100/C111 auf der Grundlage der unter Kapitel 3.1 beschriebenen zielgerichteten Mutagenese. Diese Art der Mutagenese eignet sich gut, um gezielt an definierten Bereichen der DNA, Veränderungen einzuführen (Zhao et al., 1993).

Als Substituent für die Aminosäure Cystein fiel die Wahl auf die Aminosäure Serin. Die Entscheidung wurde zugunsten dieser Aminosäure getroffen, da sie wie das Cystein zu den polaren ungeladenen Aminosäuren gehört, und sich Serin in seiner Struktur zu Cystein nur darin unterscheidet, dass es an Stelle der Sulfhydrylgruppe (SH-Gruppe) eine ungeladene polare OH-Gruppe trägt (siehe Abb. 3.1). In Bezug auf ihr Verhalten unterschieden sich die SH-Gruppe des Cysteins und die OH-Gruppe des Serins erwartungsgemäß nur hinsichtlich der Fähigkeit, eine Disulfidbrücke innerhalb der verschiedenen DsrC Proteine auszubilden. Somit war eine geeignete Voraussetzung zur Untersuchung der Disulfidbrückenbildung gegeben. Die Generierung der drei Konstrukte verlief erfolgreich, da jedes der drei Plasmide die Punktmutation nach dem jeweiligen Basenaustausch im *dsrC* Gen enthielt. Dies konnte durch eine abschließende Sequenzierung bestätigt werden.

## 4.2 Die mutierten DsrC Proteine werden korrekt gefaltet

Das zweite Teilziel dieser Arbeit beinhaltete die Überexpression und Aufreinigung der beiden hergestellten Einfachmutanten DsrC C100S und DsrC C111S sowie der Doppelmutante DsrC C100S/C111S.

In vorhergehenden Arbeiten (Pott-Sperling, 2000; Schulte, 2005), wurde das rekombinante DsrC Protein bereits überexprimiert und aufgereinigt, so dass auf die Erkenntnisse der vorhandenen Methoden zurückgegriffen werden konnte. Sowohl die Überexpression als auch die Aufreinigung der drei mutierten, rekombinanten Proteine, wurden mit diesen etablierten Methoden erfolgreich durchgeführt. Alle drei Substitutionskonstrukte wurden problemlos in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen exprimiert. Sichtbare negative Effekte des Substituenten Serin auf die Translationseffizienz wurden nicht detektiert.

Bezüglich der Aufreinigung, zeigten das mutierte, rekombinante DsrC C100S Protein (siehe Abb. 3.5, 3.10 und 3.11), das mutierte, rekombinante DsrC C111S Protein (siehe Abb. 3.6, 3.12 und 3.13) als auch die Doppelmutante DsrC C100S/C111S (siehe Abb. 3.7, 3.14 und 3.15), eine dem rekombinanten DsrC Protein (siehe Abb. 3.4, 3.8 und 3.9) entsprechende Elution hinsichtlich der Quantität und der Reinheit. Diese Ergebnisse sind der erste Hinweis auf eine richtige Faltung der mutierten DsrC Proteine und beinhalten damit gleichzeitig den Rückschluss, dass die Disulfidbrückenbildung innerhalb des DsrC Proteins für eine korrekte Faltung mutmaßlich nicht essentiell ist. Wären die Disulfidbrücken für die dreidimensionale Struktur des DsrC Proteins absolut essentiell wie dies bei einigen anderen Proteinen der Fall ist, so hätte dies mit großer Wahrscheinlichkeit zu Schwierigkeiten während der Isolierung der mutierten DsrC Proteine geführt. Die Annahme der korrekten Faltung wird auch durch Ergebnisse befürwortet, die parallel zu unseren Untersuchungen mit der NMR Spektroskopie ermittelt wurden (Cort et al., 2008). Für die Expression der dafür erforderlichen, mutierten DsrC Proteine wurden unsere generierten Plasmide zur Verfügung gestellt. Die chemische Shift Verteilung und die Linienweiten der Peaks im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC Spektrum der DsrC Mutanten sind ähnlich denen, die für das native DsrC Protein gesehen wurden. Die Überlagerung der Spektren der mutierten Proteine mit dem nativen DsrC Protein zeigte, dass die Änderungen örtlich an Sequenznachbarn und proximalen Resten in der Tertiärstruktur gebunden sind. Mit diesen Ergebnissen bestätigen die NMR spektroskopischen Untersuchungen, dass die mutierten DsrC Proteine korrekt gefaltet werden (Cort et al., 2008).

### **4.3 Die mutierten DsrC Proteine bieten konkrete Anhaltspunkte hinsichtlich des Cysteins, welches an der Dimerisierung beteiligt ist**

Bezüglich ihrer Konformationsbildung wurden die beiden Einfachmutanten und die Doppelmutante während der einzelnen Aufreinigungsschritte mit dem rekombinanten DsrC Protein verglichen.

Alle drei mutierten, rekombinanten Proteine gaben Hinweise bezüglich des Verhaltens, die Dimerisierung betreffend. Die Doppelmutante DsrC C100S/C111S, zeigte sowohl im Chromatogramm (siehe Abb. 3.14) als auch in den SDS-PAGES (Abb. 3.7 und 3.15), eindeutige Ergebnisse. Es wurde jeweils nur noch das Monomer detektiert. Damit erwies sich die vorangegangene Vermutung, dass ohne das Vorhandensein der Cysteine innerhalb des DsrC Proteins keine Dimerisierung stattfindet als korrekt.

Während der einzelnen Aufreinigungsschritte des rekombinanten, mutierten DsrC C100S Proteins (siehe Abb. 3.5, 3.10 und 3.11), wurde im Vergleich mit dem rekombinanten DsrC Protein (siehe Abb. 3.4, 3.8 und 3.9), eine eindeutige Verschiebung zugunsten der dimeren Form sichtbar. Das Monomer wurde nur noch zu einem sehr geringen Anteil eluiert. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das Cystein, welches in der Position 100 lokalisiert ist, einen „hemmenden Einfluss“ auf die Dimerisierung ausübt. Erklärbar ist dieser hemmende Einfluss durch die Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke, der Form Cys100-Cys111. Bedingt durch den Austausch des Cys100 gegen Serin, entfiel die Fähigkeit zur Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke. Als Folge bildeten die freiliegenden SH-Gruppen der Cysteine in der Position 111 miteinander intermolekulare Disulfidbrücken und ermöglichten die fast ausschließliche Bildung der dimeren Form des DsrC C100S Proteins.

Zeigte sich bei dem mutierten, rekombinanten DsrC C100S Protein eine Verschiebung zugunsten der dimeren Form, so lagen nach der Aufreinigung des mutierten, rekombinanten DsrC C111S Proteins Ergebnisse vor, die nicht miteinander korrelieren. Die Proben zeigen in den SDS-PAGES (siehe Abb. 3.6 und 3.13) gleichstarke Banden sowohl der monomeren als auch der dimeren Form. Über das Chromatogramm (Abb. 3.12) hingegen wurde ausschließlich die monomere Form detektiert. Lässt man die Daten der gelelektrophoretischen Auftrennungen zunächst einmal außer Acht und berücksichtigt nur das Ergebnis des Chromatogramms, so ist dieses im Vergleich mit den Ergebnissen des mutierten DsrC C100S Proteins durchaus schlüssig. Wie im Zusammenhang mit dieser Einzelmutante diskutiert, hat

das Cys100 auf die Dimerisierung mutmaßlich einen hemmenden Einfluss, der auf Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke mit dem Cys111 basiert. Da das DsrC C111S Protein während der Gelfiltration nur noch in seiner monomeren Form vorliegt, spricht dies zudem dafür, dass zwischen den SH-Gruppen zweier Cysteine in der Position 100 keine intermolekulare Disulfidbrücke gebildet wird. Diese Schlussfolgerung wird auch mit den Ergebnissen der NMR spektroskopischen Untersuchungen gestützt. Es gibt auch bei diesen Untersuchungen keinen Beweis für eine intermolekulare Disulfidbrückenbildung zwischen zwei Cysteinen, die in der Position 100 lokalisiert sind. Es besteht die Vermutung, dass dies darauf zurückzuführen ist, dass das Cys100 nicht auf einer exponierten nach außen gewölbten Oberfläche positioniert ist und sich seine SH-Gruppe nicht der Cys100 SH-Gruppe eines anderen DsrC Moleküls annähern kann (Cort et al., 2008).

Die in der SDS-PAGE auftretenden Banden der DsrC C111S Mutante, die die dimere Form repräsentieren, lassen sich mit dieser Interpretation jedoch nicht erklären. Die Vermutung lag nahe, dass diese Bande artifizieller Art sein könnte, die auf Parameter innerhalb der Elektrophorese zurückzuführen sind. Um dieser Problematik zu begegnen, wurden sowohl das rekombinante DsrC Protein als auch seine mutierten Proteine alkyliert, da die Alkylierung eine geeignete Voraussetzung zum Nachweis freier und gebundener SH-Gruppen bietet.

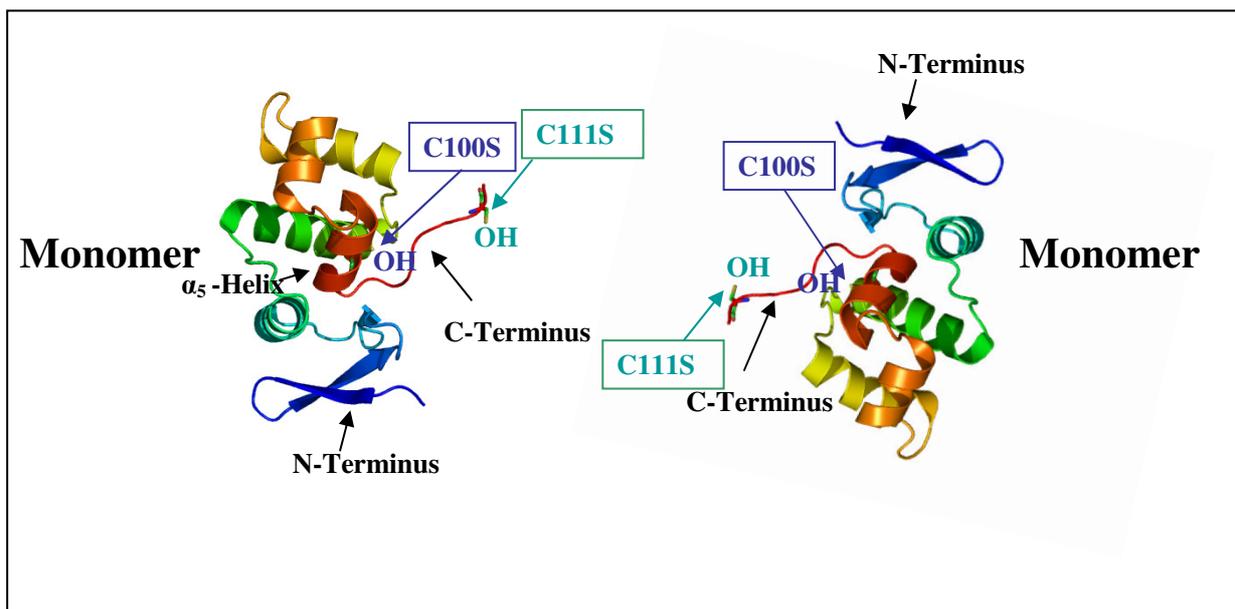
#### **4.4 Modelle zur Disulfidbrückenbildung der verschiedenen DsrC Proteine erläutert an Hand der Alkylierungsergebnisse**

Die im Folgenden diskutierten Versuche zur Alkylierung ermöglichten es, die Widersprüchlichkeiten näher zu beleuchten und die bisherigen Schlussfolgerungen mit Hilfe von hypothetischen Modellen zu untermauern.

Zur weiteren Analyse der Proteine mit Hilfe der Alkylierung wurden diese mit Jodacetamid, einem SH-Gruppen blockierenden Reagenz, inkubiert. Sichtbare Veränderungen bzw. ein sichtbarer Einfluss auf die Bandenbildung des rekombinanten, mutierten DsrC C100S/C111S Proteins, das keine modifizierbaren SH-Gruppen mehr enthält, die auf das Jodacetamid hätten zurückgeführt werden können, wurden nicht beobachtet. Das Protein zeigte auch in Anwesenheit des Jodacetamid jeweils nur eine klare Bande, die dem Monomer entspricht (siehe Abb. 3.16 - 3.18 jeweils die sechste Spur unter B). Basierend auf diesem Ergebnis, gemeinsam mit den Auswertungen der Ergebnisse, die in den Kapiteln 4.2 und 4.3

beschrieben wurden, wurde ein hypothetisches Modell des rekombinanten DsrC C100S/C111S Proteins erstellt. Mit der über die NMR Spektroskopie ermittelten Struktur des DsrC Proteins (Cort et al., 2008), konnten alle für die verschiedenen DsrC Proteine folgenden Modelle realisiert werden.

Die strukturelle Darstellung unter 4.1 zeigt ein mögliches Modell der Konformation des mutierten DsrC C100S/C111S Proteins. Innerhalb der dargestellten Struktur liegt am Ende des C-Terminus die OH-Gruppe der Aminosäure Serin, die für das substituierte Cys111 eingezeichnet wurde.



**Abb.: 4.1 Modell für das rekombinante, mutierte DsrC C100S/C111S Protein**

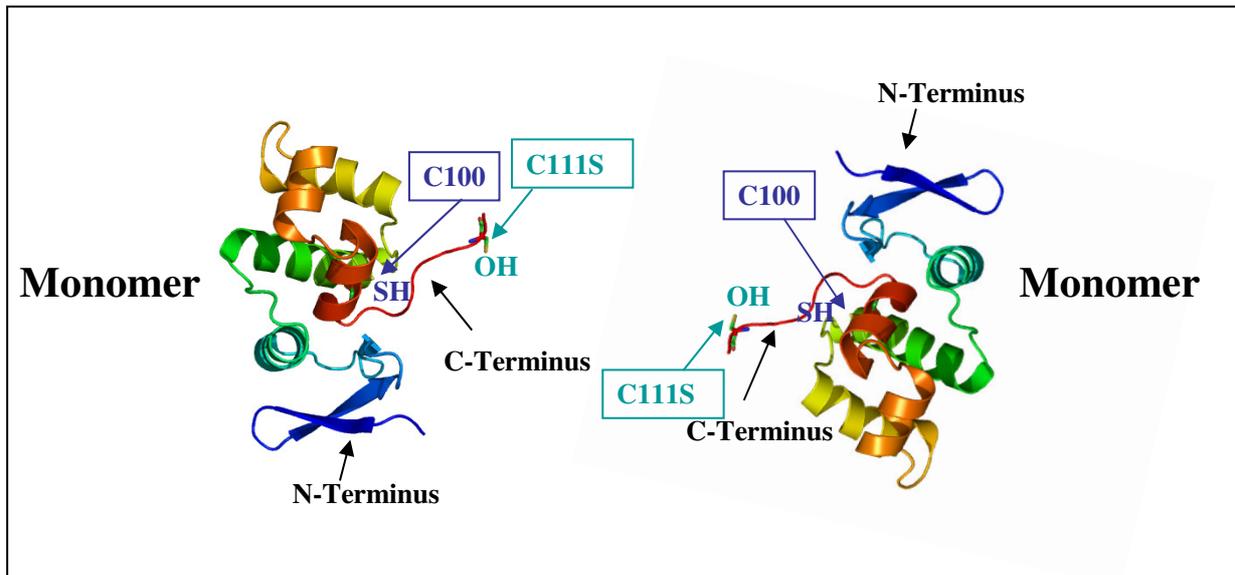
Die  $\beta$  Haarnadel bzw. der C-Terminus ragt als dunkelroter Arm aus der Struktur. Die Aminosäure Cys111 am Ende des C-Terminus wurde durch Serin substituiert, erkennbar an der grün unterlegten OH-Gruppe. Die Aminosäure Cys100 zwischen dem Ende der  $\alpha_5$ -Helix und dem Anfang des C-Terminus wurde ebenso durch Serin substituiert, erkennbar an der blau unterlegten OH-Gruppe. Nach dem Austausch der beiden Cysteine gegen Serin liegt nur die monomere Form des Proteins vor (Struktur verändert nach Cort et al., 2008).

Zwischen dem Ende der  $\alpha_5$ -Helix und dem Anfang des C-Terminus bzw. der  $\beta$ -Haarnadel, befindet sich eine OH-Gruppe stellvertretend für die Aminosäure Serin, die die Aminosäure Cys100 substituierte. Aufgrund der fehlenden SH-Gruppen ist weder eine inter- noch eine intramolekulare Disulfidbrückenbildung möglich. Als Konsequenz liegt das DsrC C100S/C111S Protein nur in Form eines Monomers vor.

Das Fehlen unerwünschter Nebeneffekte, die aufgrund der Jodacetamid Behandlung hätten entstehen können, bestätigte die Doppelmutante als Kontrolle und bot somit eine gute Ausgangsbasis auch zur Beurteilung der beiden alkylierten Einfachmutanten, DsrC C111S und DsrC C100S sowie des rekombinanten DsrC Proteins, die im Folgenden diskutiert und dargestellt werden.

Das rekombinante, mutierte DsrC C111S Protein zeigte wie unter Kapitel 4.3 diskutiert nicht miteinander korrelierende Ergebnisse. Hinsichtlich dieser widersprüchlichen Aussagen brachte die Alkylierung eine Klärung. Nach erfolgter Behandlung mit Jodacetamid (Abbildungen 3.16 - 3.18, jeweils die fünfte Spur unter B), liegt das Protein fast ausschließlich in der monomeren Form vor. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die SH-Gruppe, des sich in Position 100 befindenden Cysteins während der einzelnen Aufreinigungsschritte nicht innerhalb einer Disulfidbrücke gebunden vorlag. Infolgedessen konnte sie durch die Alkylierung für eine spätere Disulfidbrückenbildung blockiert werden.

Damit ist die Annahme wahrscheinlich, dass das nicht alkylierte, rekombinante, mutierte DsrC C111S Protein, zum einen vermutlich während der Elektrophorese, bedingt durch SDS bei den niedrigen Inkubationstemperaturen von 30°C und 6°C, zum anderen durch Kochen, denaturiert wurde. Mit Hilfe des hypothetischen Modells, das die Struktur des rekombinanten DsrC C111S Proteins in der Abbildung 4.2 darstellt, lassen sich diese und weitere Erklärungen anschaulich nachvollziehen. Deutlich erkennbar ist, dass die noch vorhandene SH-Gruppe des Cys100 zwischen dem Ende der  $\alpha_5$ -Helix und dem Anfang des C-Terminus schwerer zugänglich ist als die OH-Gruppe des Serins, die am Ende des C-Terminus stark exponiert vorliegt. Ein besserer Zugang zur SH-Gruppe, die in der Position 100 lokalisiert ist, würde durch eine Entfaltung erreicht. Als Konsequenz einer Denaturierung wird das zuvor wenig exponierte Cys100 von räumlichen Gesichtspunkten her leichter erreichbar. Damit wäre auch die Möglichkeit zur Dimerisierung in der Form Cys100-Cys100 gegeben. Nach abgeschlossener Alkylierung und der damit einhergehenden Blockierung der SH-Gruppe des Cys100, kann diese Dimerisierung nicht mehr stattfinden. Die in den SDS-PAGES auftretenden Banden, die die dimere Form repräsentieren, können aufgrund dieser diskutierten Ergebnisse als artifiziell eingestuft werden und beweisen, dass das Cys100 ohne Denaturierung nicht an einer Dimerisierung beteiligt ist.

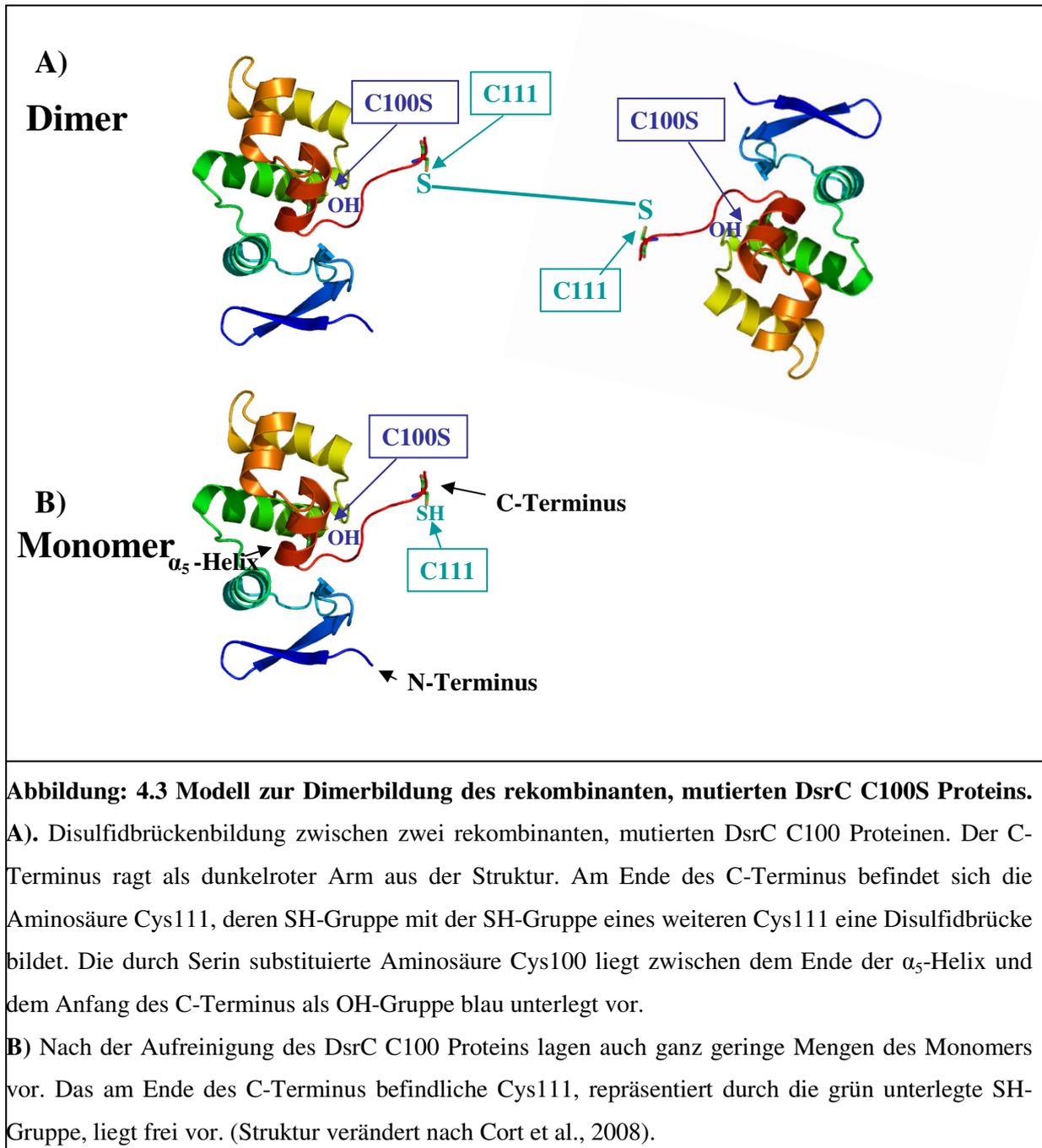


**Abb.: 4.2 Modell des rekombinanten, mutierten DsrC C111S Proteins.** Der C-Terminus ragt als dunkelroter Arm aus der Struktur. Die Aminosäure Cys111 am Ende des C-Terminus wurde durch Serin substituiert, erkennbar an der grün unterlegten OH-Gruppe. Die Aminosäure Cys100 liegt zwischen dem Ende der  $\alpha_5$ -Helix und dem Anfang des C-Terminus als blau unterlegte SH-Gruppe vor. Es werden keine Dimere der Form Cys100-Cys100 gebildet. (Struktur verändert nach Cort et al., 2008).

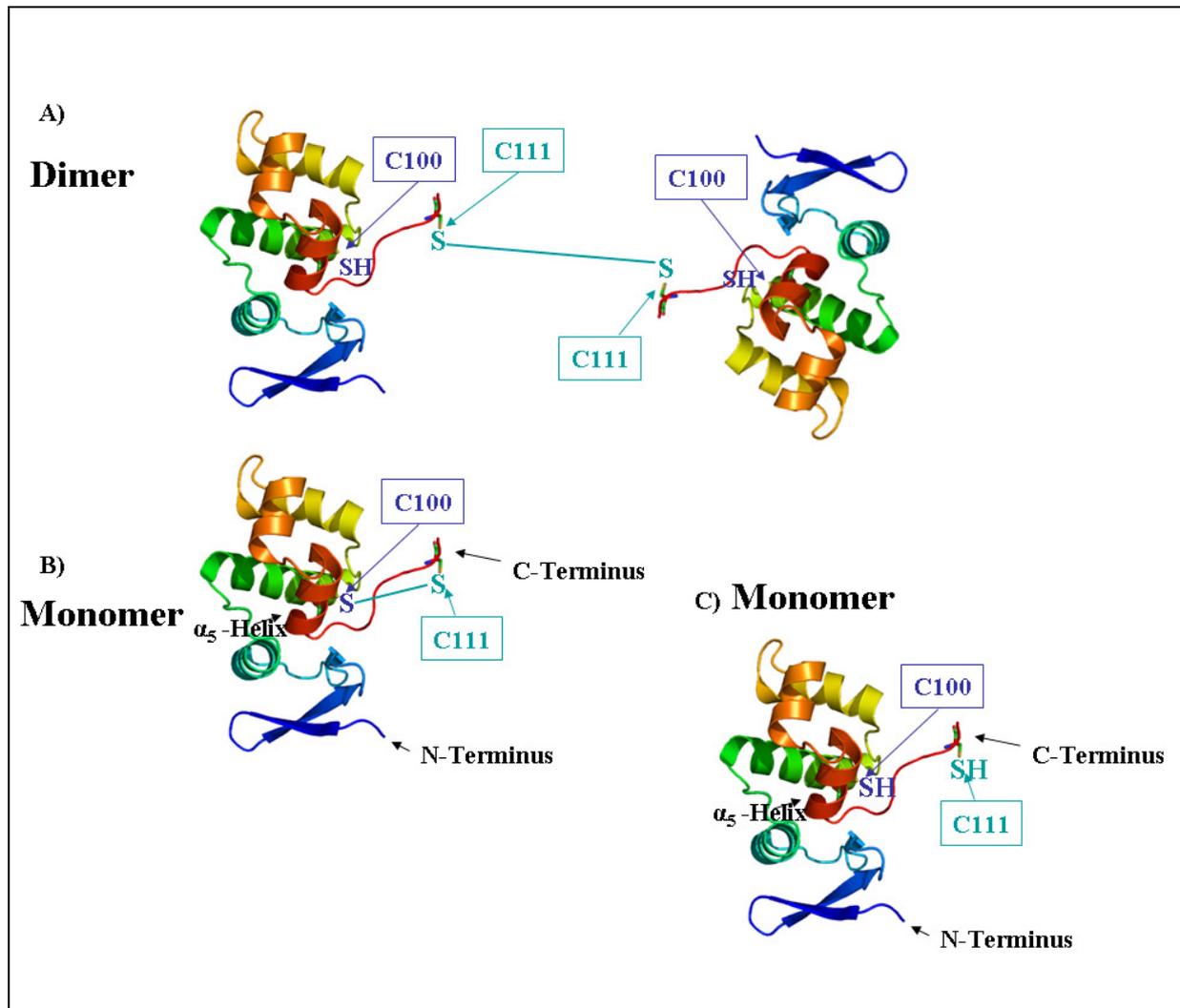
Das rekombinante, mutierte DsrC C100S Dimer lag sowohl vor als auch nach der Alkylierung komplett als Dimer vor (siehe Abb. 3.16 - 3.18, jeweils die vierte Spur unter A und B). Das ist ein eindeutiger Hinweis dafür, dass bereits vor der Alkylierung die Cysteine der Position 111 innerhalb von Cys111-Cys111 Dimeren gebunden vorlagen, andernfalls hätte die Alkylierung freiliegender Cys111 SH-Gruppen einen fast ausschließlichen Anteil der monomeren Form zur Folge gehabt. Im dargestellten, hypothetischen Modell innerhalb der Abbildung 4.3 unter A, ist deutlich erkennbar wie gut sich das Cys111 infolge seiner exponierten Lage am C-Terminus ohne sterische Hinderung und Spannung mit dem Cys111 eines zweiten DsrC C100S Proteins verbinden kann. Denn damit innerhalb einer Disulfidbrücke keine sterischen Spannungen entstehen, ist eine definierte Geometrie der involvierten Cysteine notwendig. Eine sterische Spannung wird verhindert, wenn die Schwefelatome innerhalb der Disulfidbrücke einen Abstand von etwa 2 Å aufweisen. Die Winkel zwischen dem Sulfid und den  $\beta$ -Kohlenstoffatomen der beteiligten Cysteine sollten im Bereich von  $103^\circ$  liegen (Creighton, 1988).

Es kann auch ausgeschlossen werden, dass Denaturierungsprozesse, verursacht durch SDS oder durch Kochen, zur Bildung dieser Cys111-Cys111 Dimere geführt haben. Auch in diesem Fall, hätten als eine Folge der Alkylierung, große Mengen des Monomers vorliegen

müssen. Das in sehr geringen Mengen eluierte DsrC C100S Monomer, ist unter der Abbildung 4.3 B dargestellt.



Die zu den einzelnen Mutanten diskutierten Ergebnisse, ermöglichten die abschließende Darstellung für die Bindungsmöglichkeiten des Cys100 und des Cys111 des rekombinanten DsrC Proteins. Chromatogramm und SDS-PAGE des rekombinanten DsrC Proteins (siehe Abb. 3.8 und 3.9), zeigen voneinander abweichende Ergebnisse.



**Abb.: 4.4 Modell zur Dimerbildung des rekombinanten DsrC Proteins.**

**A): Dimerbildung zwischen zwei rekombinanten DsrC Proteinen.** Der C-Terminus ragt als dunkelroter Arm aus der Struktur heraus. Am Ende des C-Terminus befindet sich die Aminosäure Cys111, dargestellt durch eine grün unterlegte SH-Gruppe, die mit dem Cys111 eines weiteren DsrC Proteins eine intermolekulare Disulfidbrücke bildet. Die blau unterlegte SH-Gruppe, zwischen dem Ende der  $\alpha_5$ -Helix und dem Anfang des C-Terminus, repräsentiert das Cys100, das ungebunden vorliegt. **B): Dargestellt ist die monomere Form des DsrC Proteins mit einer ausgebildeten intramolekularen Disulfidbrücke.** Zwischen dem Ende der  $\alpha_5$ -Helix und dem Anfang des C-Terminus befindet sich das Cys100, repräsentiert durch das blau unterlegte S Atom. Am Ende des C-Terminus liegt grün unterlegt, das S Atom, welches das Cys111 repräsentiert. Zwischen dem Cys100 und dem Cys111 befindet sich eine ausgebildete intramolekulare Disulfidbrücke, die durch oxidierende Bedingungen, in Folge längerer Inkubation bei Raumtemperatur oder durch Zugabe von  $H_2O_2$  gebildet wird.

**C): Dargestellt ist die monomere Form des DsrC Proteins wie sie unter reduzierten Bedingungen vorliegt.** Die beiden SH-Gruppen liegen in ihrer reduzierten Form vor (Struktur verändert nach Cort et al., 2008).

Im Chromatogramm (siehe Abb. 3.8), ist der Peak, über den die dimere Form eluierte, anteilmäßig wesentlich stärker ausgeprägt als der Peak, über den die monomere Form eluierte. Fraktionen, die dem Eluat der dimeren Form entnommen und über die SDS-PAGE aufgetrennt wurden, liegen anschließend überwiegend in der monomeren Form (siehe Abb. 3.9) und nach erfolgter Alkylierung wieder vorwiegend in der dimeren Form vor (siehe Abb. 3.16 - 3.18 jeweils zweite Spur unter B.). Unter Berücksichtigung der Auswertungen, die die mutierten DsrC Proteine betreffen, werden während der Gelfiltration neben der eluierten monomeren Form, in der die SH-Gruppen beider Cysteine frei vorliegen, dargestellt unter Abbildung 4.4 C, intermolekulare Cys111-Cys111 Dimere gebildet (siehe Abb. 4.4 unter A). Im Zuge der NMR spektroskopischen Untersuchungen konnte ermittelt werden, dass Cys111-Cys111 Dimere unter nicht reduzierenden Bedingungen während der Exposition an Luftsauerstoff schnell gebildet werden. Sie sind die thermodynamisch weniger stabile Form (Cort et al., 2008), dargestellt in der Abbildung 4.4 unter A. Die Cysteine in der Position 100 liegen zu diesem Zeitpunkt ungebunden vor, erkennbar an der blau unterlegten SH-Gruppe. Wurde das DsrC Protein über einen Zeitraum von zwei Stunden, Temperaturen von 6°C, Raumtemperatur oder 30°C ausgesetzt, so konnten freiliegende SH-Gruppen des Cys100, die vorhandenen intermolekularen Cys111-Cys111 Disulfidbrücken durch die Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke der Form Cys100-Cys111 auflösen. Daraus resultiert die hauptsächlich monomere auftretende Form in den SDS-PAGES (siehe Abb. 3.16 - 3.18, jeweils die zweite Spur unter A.).

Auch die Versuche zur NMR Spektroskopie zeigten, dass ein nicht gebundener freier Cysteinrest in Position 100, infolge längerer Inkubation bei Raumtemperatur oder infolge einer Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, die bereits existierenden intermolekularen Disulfidbrücken auflösen kann, indem er innerhalb eines Cys111-Cys111 Dimers eines dieser Cysteine ersetzt (Cort et al., 2008). Die daraus resultierende, intramolekulare Disulfidbrückenbildung der Form Cys100-Cys111 wird unter Abbildung 4.4 B repräsentiert. Die intramolekular gebildete Disulfidbrücke ist die thermodynamisch stabilere Form (Cort et al., 2008), die durch Nutzung reduzierender Agenzien wie TCEP wieder regeneriert werden kann (siehe Abb. 3.19) und daraufhin wieder die ursprüngliche monomere Form in ihrem reduzierten Status darstellt (siehe Abb. 4.4 C).

Eine unmittelbar im Anschluss an die Gelfiltration durchgeführte Alkylierung führt zur Blockierung der in Position 100 freiliegenden SH-Gruppe, die daraufhin nicht mehr für eine weitere Reaktion zur Verfügung steht, um vorhandene Cys111-Cys111 Dimere aufzulösen.

Daraus resultiert die überwiegend dimere Form des DsrC Proteins in den SDS-PAGES nach der Alkylierung (siehe Abb. 3.16 - 3.18, jeweils die zweite Spur unter B).

Die bisher diskutierten Ergebnisse bestätigen, dass das Cys111 ursächlich für die Dimerbildung ist, während das Cys100 nicht für die Dimerisierung, aber für die Bildung intramolekularer Disulfidbrücken verantwortlich ist.

## **4.5 Erste Anhaltspunkte für die Ursachen der intra- und intermolekularen Disulfidbrückenbildung**

Die bisherigen Untersuchungen werfen die Frage nach der Funktion der intra- und intermolekularen Disulfidbrücke des rekombinanten DsrC Proteins auf.

Die Funktion eines Proteins hängt von seiner dreidimensionalen Struktur ab. In erster Linie entsteht diese Struktur aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zwischen apolaren Seitenketten. Bei einigen Proteinen sind Disulfidbrücken essentiell für die dreidimensionale Struktur. Für das DsrC Protein konnte jedoch mit Hilfe der mutierten DsrC Proteine gezeigt werden, diskutiert unter Kapitel 4.2, dass die Disulfidbrücken nicht für die korrekte Faltung des DsrC Proteins entscheidend sind.

Hinsichtlich der Disulfidbrücken liegt die eigentliche Problematik beim DsrC Protein darin begründet, dass es sich bei diesem Protein um ein cytoplasmatisches Protein handelt. Die Disulfidbrückenbildung erfolgt bei Prokaryoten innerhalb des oxidierenden Milieus des Periplasmas durch das Dsb-System (Fabianek et al., 2000). Das DsrC Protein verlässt aber als Protein ohne Signalsequenz nicht das Kompartiment Cytoplasma. Im Cytoplasma selbst, dort, wo alle Proteine synthetisiert werden, herrscht ein reduzierendes Milieu, so dass innerhalb dieses Milieus die Thiolgruppen reduziert vorliegen. Infolgedessen enthalten Proteine im Cytoplasma in der Regel keine Disulfidbrücken (Gilbert, 1994). Beim Auftreten einer Störung des Redoxstatus innerhalb des Cytoplasmas, wird dieses durch zwei Systeme, das Glutaredoxinsystem, welches aus Glutathionreduktase, Glutathion und Glutaredoxinen (Prinz et al., 1997) besteht und das Thioredoxinsystem, bestehend aus Thioredoxinreduktase und zwei Thioredoxinen (Åslund und Beckwith, 1999), aufrechterhalten. Diese beiden für die Reduktion der Disulfidbrücken verantwortlichen, aber voneinander unabhängigen Systeme, können sich in vivo teilweise ersetzen. Das DsrC Protein wurde zwar rekombinant aufgereinigt, aber in vitro führen ähnliche Verhältnisse zu einem Redoxpotential, das die Bildung von Disulfidbrücken in den meisten Proteinen verhindert (Hwang et al., 1992). In

in vitro wird eine große Zahl von Proteinen durch Thioredoxin reduziert (Holmgren, 1984 und Holmgren, 1985).

Es gibt Beispiele für Proteine, die trotz des reduzierenden Milieus des Cytoplasmas Disulfidbrücken ausbilden. Die betreffenden Disulfidbrücken werden nur vorübergehend gebildet bzw. gehen langsam von einem Zustand in einen anderen über. Dabei treten innerhalb des betreffenden Proteins Konformationsänderungen auf, die der Regulation dienen. Ein Beispiel ist das OxyR Protein aus *E. coli*. Dieses Protein hat eine Funktion als Transkriptionsfaktor. Seine Funktion wird durch eine Disulfidbrücke gesteuert, das heißt, der Transkriptionsfaktor wird bei oxidativem Stress durch Ausbildung einer Disulfidbrücke angeschaltet (Zheng et al., 1998; Åslund und Beckwith 1999).

Ebenso gehört das Hitzeschockprotein, Hsp33 zu einer solchen Ausnahme bezüglich der Disulfidbrückenbildung im Cytoplasma. Seine Funktion wird durch die Oxidation der Cysteinreste zu Disulfidbrücken aktiviert. Dabei könnte es auch eine Rolle spielen, dass Disulfidbrücken durch die Einschränkung des Konformationsraumes die Entropie des ungeordneten Zustandes erniedrigen, und sie den nativen Zustand durch Stabilisierung energetisch bevorzugter Wechselwirkungen begünstigen (Darby und Creighton, 1997).

Es besteht die Möglichkeit, dass die intra- sowie die intermolekulare Disulfidbrücke des rekombinanten DsrC Proteins ebenfalls nur transient gebildet werden. Sie könnten der Regulation dienen. Es macht durchaus Sinn und ist in Betracht zu ziehen, dass die Funktion des DsrC Proteins durch Ausbildung intra- und intermolekularer Disulfidbrücken reguliert wird.

Eine Annäherung zur möglichen Funktion der intra- und intermolekularen Disulfidbrücken des DsrC Proteins, ergibt sich bei Betrachtung der Interaktionsergebnisse mit dem DsrEFH Proteinkomplex.

#### **4.6 Inkubationen zwischen DsrC sowie DsrC C100S mit dem DsrEFH Proteinkomplex führen zu dessen Konformationsänderung**

Den ersten Hinweis auf eine Interaktion zwischen rekombinantem DsrC und dem rekombinanten DsrEFH Proteinkomplex, lieferten Untersuchungen, die von Schulte (2005) durchgeführt wurden. Eine gemeinsame Inkubation der benannten Proteine, führte zur Bildung eines Bandshifts (Schulte, 2005). Eine ESI-MS-Analyse des gebildeten Bandshifts,

identifizierte die neu gebildete Bande als den DsrEFH Proteinkomplex. Eine kovalente Bindung zwischen DsrC und dem DsrEFH Komplex wurde nicht detektiert (Schulte, 2005).

Mit der Fortführung dieser Untersuchungen, beschäftigte sich ein weiteres Teilziel dieser Arbeit. Dabei stellte sich die Frage, ob die Interaktionsfähigkeit zwischen dem DsrC Protein und dem DsrEFH Proteinkomplex durch den Austausch eines der beiden oder beider Cysteine Cys100 und Cys111 gegen Serin verändert wird. Das beinhaltet gleichzeitig die Frage, inwieweit die Fähigkeit des rekombinanten DsrC Proteins, Disulfidbrücken innerhalb des reduzierenden Milieus zu bilden, mit einer Interaktion des rekombinanten DsrEFH Proteinkomplexes in Zusammenhang zu bringen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, die unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgereinigte monomere und dimere Form des rekombinanten DsrC Proteins mit dem rekombinanten DsrEFH Proteinkomplex inkubiert. Die optimale Interaktion wurde bei einer DsrC Proteinmenge von 200 pmol und einer DsrEFH Proteinmenge von 100 pmol erreicht. Die Inkubationen resultierten bei beiden eingesetzten DsrC Formen in der Ausbildung einer neuen Bande, in einigen wenigen Ausnahmen beim eingesetzten DsrC Monomer, in der Ausbildung zweier Banden.

Die Veränderung des Inkubationsmilieus durch Zugabe des Reagens TCEP, das reduzierende Bedingungen schafft, beeinflusste die Interaktion positiv. Das Ermitteln der TCEP Endkonzentration, die zu einer signifikanten Steigerung der Interaktion führte, erforderte vielfältige Inkubationsversuche, innerhalb derer die TCEP Endkonzentrationen variiert wurden. Letztendlich förderte die definierte TCEP Endkonzentration von 0,025-0,05 mM im Inkubationsansatz mit der monomeren Form des DsrC Proteins eine wesentliche Intensivierung der Reaktion, die sich in der Ausbildung zweier neuer Banden manifestierte (siehe Abbildung 3.22: Spuren acht und neun). Diese Banden entsprachen in ihrer Stärke jeweils der Bande, die den DsrEFH Proteinkomplex repräsentiert. Diese „ursprüngliche“ Bande wurde, dabei zugunsten der beiden neu ausgebildeten Banden, fast vollständig aufgelöst. Versuche mit der dimeren DsrC Form führten mit TCEP Endkonzentrationen im Bereich von 0,1-0,05 mM im Inkubationsansatz, im Gegensatz zum unreduzierten Milieu, zu einer Verstärkung der hier vorliegenden neuen Bande (siehe Abbildung 3.23: Spuren sieben bis neun). Die von Anfang an geringere Interaktionstärke bei Nutzung der dimeren Form, mutmaßlich auf Spuren des DsrC Monomers zurückzuführen, ist ein Hinweis darauf, dass das DsrC Monomer der entscheidende Interaktionspartner für den DsrEFH Proteinkomplex ist.

Die monomere Form der Einfachmutante DsrC C100S führte bei Inkubation mit dem DsrEFH Proteinkomplex, bei der optimierten TCEP Endkonzentration von 0,025 mM, zur Bildung

zweier neuer Banden. Inkubationen des rekombinanten DsrEFH Proteinkomplexes führten weder mit der Doppelmutante DsrC C100S/C111S noch mit der Einfachmutante DsrC C111S, zur Ausbildung zusätzlicher Banden (siehe Abbildung 3.23).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass das ungebundene Cys111 der monomeren DsrC Form entscheidend für die Interaktion und der damit einhergehenden neuen Bandenbildung ist. Die „neuen und langsamer“ laufenden Banden, die die ursprüngliche, den DsrEFH Proteinkomplex repräsentierende Bande ersetzen, sprechen für eine Konformationsänderung des Komplexes. Die definierte TCEP Endkonzentration, die die Interaktion zwischen den Proteinen begünstigt, lässt vermuten, dass die stattfindenden Interaktionen tatsächlich auf das reduzierende Milieu des Cytoplasmas angewiesen sind. Das konstitutiv gebildete DsrC Protein (Pott und Dahl, 1998), könnte dabei sowohl einen fördernden als auch einen limitierenden Faktor bilden.

#### **4.7 Mögliche Funktionen des DsrC Proteins und des DsrEFH Proteinkomplexes**

In der vorliegenden Arbeit konnten für das DsrC Protein Einblicke hinsichtlich der intra- und intermolekularen Disulfidbrückenbildung wie auch hinsichtlich seiner Interaktion mit dem DsrEFH Proteinkomplex gewonnen werden. Bringt man diese Ergebnisse in den Zusammenhang, so ist es möglich ein gemeinsames, hypothetisches Modell für die Funktionen sowohl des DsrC als auch des DsrEFH Komplexes zu erstellen. Dabei ist es von Relevanz, weitere Ergebnisse, die im Zusammenhang mit diesen Proteinen stehen, mit einzubeziehen.

Zwei erste Ergebnisse, die die Bedeutung sowohl des DsrC Proteins als auch des DsrEFH Proteinkomplexes innerhalb des Schwefel oxidierenden Bakteriums *Allochromatium vinosum* unterstreichen, sind das Verhalten zweier in „frame-Deletionsmutanten“. Wurden das *dsrC* Gen als auch die *dsrEFH* Gene unabhängig voneinander deletiert, so erwiesen sich beide Deletionsmutanten als genetisch instabil (Cort et al., 2008). Im Gegensatz dazu ist eine Mutante, die nur eine Deletion des *dsrE* Gens trägt, genetisch stabil und lebensfähig (Grimm & Dahl, unveröffentlichte Daten). Auf der anderen Seite steht die Tatsache, dass das *dsrC* Gen konstitutiv von seinem eigenen Promotor transkribiert wird, der innerhalb des *dsrF* Gens liegt (Pott und Dahl, 1998).

Die gemeinsame Kopurifikation mit den Proteinen DsrAB und Proteinen des Membran umspannenden DsrMKJOP Komplexes (Dahl et al., 2005), deutet auf einen mutmaßlichen

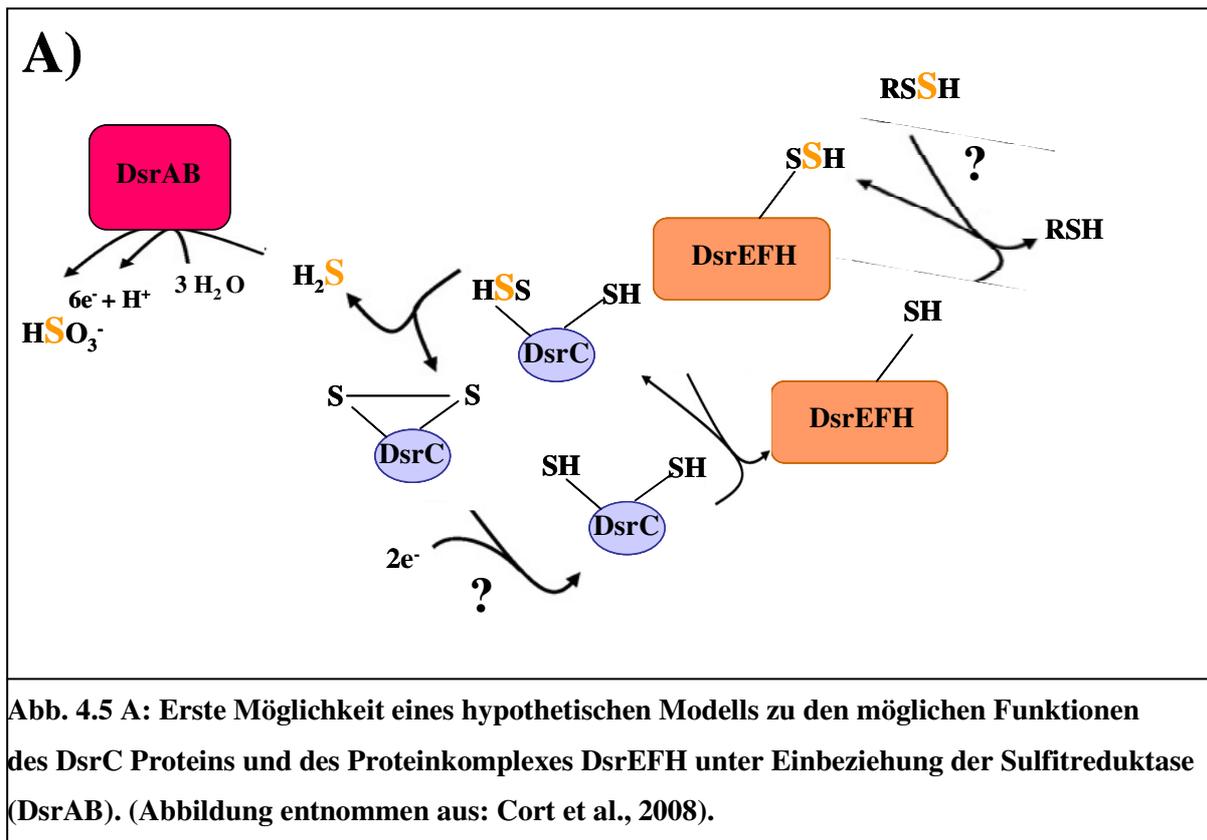
Zusammenhang zwischen diesen Proteinen und spricht dafür, dass dieser von funktioneller Bedeutung sein könnte. Besondere Beachtung kann der Tatsache beigemessen werden, dass das DsrK Protein des DsrMKJOP Komplexes eine Homologie zu der cytoplasmatischen Untereinheit (HdrD) der Heterodisulfidreduktase (HdrDE) aus *Methanosarcina barkeri* aufweist (Heiden et al., 1994; Sander, 2005). Im Stoffwechsel von methanogenen Archaeen spalten die Heterodisulfidreduktasen, das bei der Kohlendioxidreduktion gebildete Heterodisulfid CoM-S~S-CoB wieder in die Ausgangskomponenten CoM-SH und CoB-SH, unter Freisetzung von Methan (Thauer, 1998). Das lässt die nahe liegende Vermutung zu, dass das DsrC Protein analog zu dem archaealen Heterodisulfid ein „bakterielles Heterodisulfid“ sein könnte (Dahl, 2008; Grimm et al., 2008). Auch die in dieser Arbeit beschriebenen Thiol/Disulfidumwandlungen könnten auf ein solches „bakterielles Heterodisulfid schließen lassen.

Insbesondere erwähnenswert ist die Tatsache, dass die zu DsrC und DsrEFH homologen Proteine TusE (DsrC) und TusBCD (DsrEFH) aus *Escherichia coli* in einem Schwefeltransfer involviert sind. (Ikeuchi et al., 2006). Es wurde eine 2-Thiouridin Bildung in vitro mit rekombinantem TusA, dem TusBCD Komplex, TusE sowie IscS und MnmA durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Desulfurase Aktivität von IscS durch die Bindung von TusA stimuliert wird. IscS transferierte in der Folge den Persulfid Schwefel zu TusA. Der TusBCD Komplex wurde durch TusE gebunden und stimulierte dabei den Schwefeltransfer von TusA zu TusD (Ikeuchi et al., 2006).

Auch wurde ein Modell veröffentlicht, in dem gezeigt wird, dass Schwefel von den periplasmatischen Schwefelkugeln durch ein Perthiol-Trägermolekül zum Cytoplasma transportiert wird (Frigaard und Dahl, 2009; Grimm et al., 2008; Dahl, 2008).

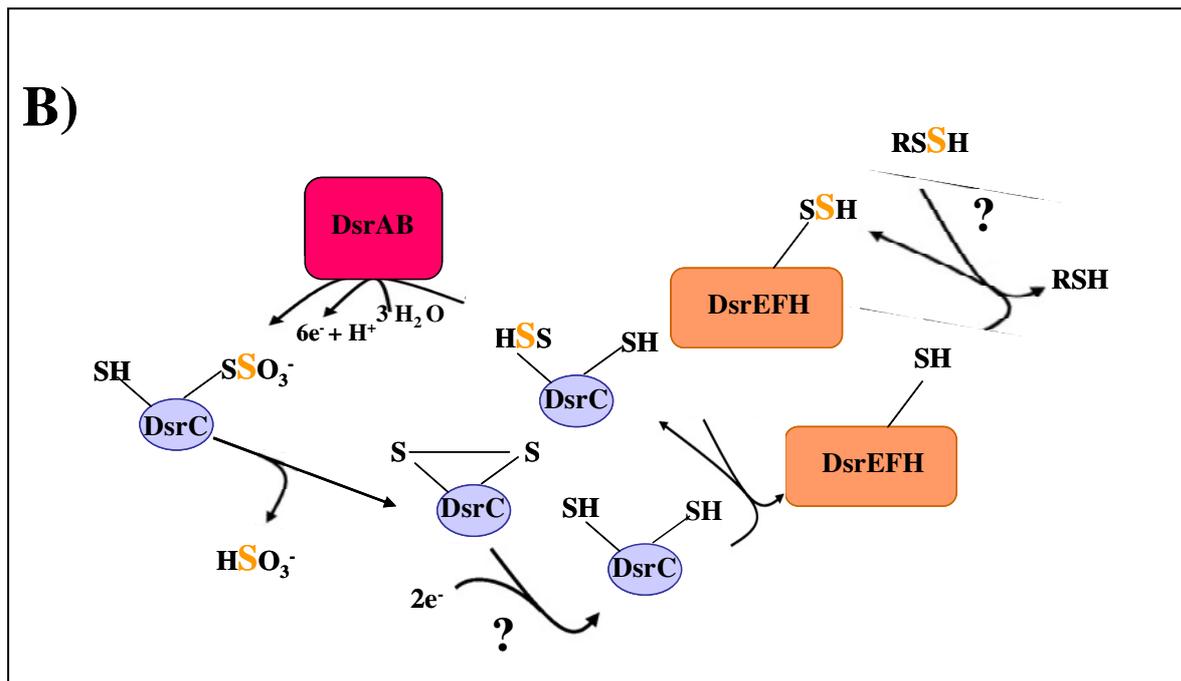
Unter Berücksichtigung all dieser Zusammenhänge werden die folgenden Modelle, dargestellt in den Abbildungen 4.5 A und 4.5 B, diskutiert.

In der Abbildung 4.5 A, ist die erste Möglichkeit dargestellt wie die Proteine DsrAB, DsrC und DsrEFH miteinander interagieren könnten. Dabei agiert der DsrEFH Proteinkomplex durch sein konserviertes Cys78 in DsrE als cytoplasmatischer Akzeptor für den Persulfidschwefel, und in Analogie zu den oben erwähnten verwandten Proteinen aus *E. coli* könnte das DsrC Protein ein Schwefelatom vom DsrE des DsrEFH Proteinkomplexes aufnehmen.



Der Persulfidschwefel, der Oxidationsstufe Null, könnte in seiner reduzierten Form als ein Substrat für die Sulfitreduktase (DsrAB) freiwerden. Während dieser Reaktion wird zwischen den beiden konservierten Cysteinresten, dem Cys100 und dem Cys111 des DsrC Proteins eine Disulfidbrücke ausgebildet. Sulfid ist mutmaßlich ein Substrat für die Sulfitreduktase und agiert in die oxidierende Richtung, da Sulfid bei den Sulfat reduzierenden Bakterien ein Produkt der Sulfitreduktasen ist. Die Bindung von DsrC an DsrAB könnte die reduktive Sulfidfreilassung stimulieren, indem der carboxyterminale Arm forciert wird, eine Konformation anzunehmen, die die Cys100 und Cys111 Thiole in enge Nachbarschaft führt wie es für die X-Ray (Röntgen) Struktur von *Archaeoglobus fulgidus* gesehen wurde (Mander et al., 2005).

Das zweite Modell, dargestellt unter 4.5, B, geht von einer direkteren Interaktion zwischen den Proteinen DsrAB und DsrC aus, in welcher der Schwefel, der am Cys111 gebunden ist, zu der aktiven Seite des DsrAB gereicht wird. Diese Hypothese kann mit Hilfe von Ergebnissen unterstützt werden, die bereits für einige Sulfat Reduzierer diskutiert wurden. Dabei wurde wie es für die Reaktion zwischen DsrAB und DsrC beschrieben wird, eine feste Komplexbildung zwischen DsrAB und DsrC beobachtet (Pierik et al., 1992; Steuber et al., 1995, Schiffer et al., 2008).



**Abb. 4.5 B: Zweite Möglichkeit eines hypothetischen Modells der möglichen Funktionen des DsrC Proteins sowie des DsrEFH Proteinkomplexes unter Einbeziehung der Sulfit-reduktase (DsrAB). (Abbildung entnommen aus: Cort et al., 2008).**

Ein weiterer Schritt innerhalb des Modells 4.5 B zeigt, dass sich das DsrC Protein wieder von der Sulfitreduktase gelöst hat und eine Sulfonatgruppe trägt. Durch die Bildung einer Cys100-Cys111 Disulfidbrücke wird das Sulfid wieder freigelassen.

Letztendlich wird DsrC zurückgebildet und steht dann als Akzeptor für das nächste Schwefelatom zur Verfügung.

## Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit konnte die Beteiligung des Cys111 an einer Interaktion mit dem Heterohexamer DsrEFH nachgewiesen werden. Ferner wurde ein mögliches Modell einer gemeinsamen Interaktion der Proteine DsrAB, DsrC und dem DsrEFH Proteinkomplex postuliert. Dies bietet den Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen, bei denen auch die Frage zu klären ist wie die angedeutete Involvierung dieser Proteine mit den Proteinen des Membran umspannenden Komplexes DsrMKJOP aussehen könnte.

Weitere Protein übergreifende biochemische Untersuchungen sind unabdingbar, um diese Fragen zu klären.

## 5 Zusammenfassung

Für das cytoplasmatische DsrC Protein, des Schwefel oxidierenden Bakteriums *Allochromatium vinosum* wurden, mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese, drei rekombinante Substitutionsmutanten, generiert. Die beiden Einfachmutanten *dsrC C100* und *dsrC C111* sowie die Doppelmutante *dsrC C100/C111* wurden in den pET15b Vektor inkloniert und exprimiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass infolge der Austausch der Cysteine innerhalb der drei mutierten Proteine DsrC C100S, DsrC C111S und DsrC C100S/C111S, die Expression und Aufreinigung nicht beeinträchtigt wurden. Gemeinsam mit den Auswertungen der NMR spektroskopischen Untersuchungen (Cort et al., 2008), war das ein Hinweis dafür, dass die mutierten Proteine korrekt gefaltet wurden und führten zu der Schlussfolgerung, dass die ausgebildeten Disulfidbrücken des rekombinanten DsrC Proteins für die Faltung nicht essentiell sind.

Die Substitution der beiden Cysteine Cys100 und Cys111 bedingte das Fehlen jeglicher Disulfidbrücken. Das Cystein 111 konnte als ursächlich für die intermolekulare Disulfidbrückenbildung und der damit einhergehenden Homodimerbildung identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Cys111-Cys111 Dimere, die die thermodynamisch weniger stabile Form darstellen, schnell unter nicht reduzierenden Bedingungen bei der Exposition an Luftsauerstoff gebildet werden. Diese thermodynamisch weniger stabile Form geht bei längerer Inkubation oder durch Verwendung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in eine thermodynamisch stabile Form über, indem die freiliegende SH-Gruppe eines Cys100 ein Cys111 innerhalb eines Cys111-Cys111 Dimers austauscht und somit eine intramolekulare Disulfidbrücke, der Form Cys100-Cys111, bildet.

Mit Hilfe der mutierten DsrC Proteine konnte geklärt werden, dass für eine mit dem DsrEFH Proteinkomplex stattfindende Interaktion, das Cystein 111 essentiell ist. Bei dieser Interaktion findet eine Konformationsänderung des Heterohexamers DsrEFH statt.

Die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen des Reduktionsmittels TCEP zeigte, dass eine definierte TCEP Endkonzentration die Interaktion zwischen dem rekombinanten DsrC und dem rekombinanten Heterohexamer DsrEFH entscheidend fördert. Abschließend wurde postuliert, dass die Proteine DsrAB, DsrC und der DsrEFH Proteinkomplex an einem Schwefeltransfer beteiligt sind wie es analog zu den verwandten Proteinen aus *E. coli* diskutiert wurde.

---

## 6 Literatur

**Andersson, J. O. und Roger, A. J.** (2002). Evolutionary analyses of the small subunit of glutamate synthase: gene order conservation, gene fusions, and prokaryote-to-eukaryote lateral gene transfers. *Eukaryot Cell* **1**(2): 304-310.

**Arendsen, A. F., Verhagen, M. F., Wolbert, R. B., Pierik, A. J., et al.** (1993). The dissimilatory sulfite reductase from *Desulfosarcina variabilis* is a desulforubidin containing uncoupled metalated sirohemes and S = 9/2 iron-sulfur clusters. *Biochemistry* **32**(39): 10323-10330.

**Åslund, F. und Beckwith, J.** (1999). Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation. *Cell* **96**(6): 751-753.

**Bardwell, J. C.** (2004). The dance of disulfide formation. *Nat Struct Mol Biol* **11**(7): 582-583.

**Berks, B. C.** (1996). A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* **22**(3): 393-404.

**Berks, B. C., Sargent, F. und Palmer, T.** (2000). The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* **35**(2): 260-274.

**Berresheim, H.; Wine, P.H. und Davies, D.D.** (1995). Sulfur in the Atmosphere. *In* Composition, Chemistry, and Climate of the Atmosphere. (H.B. Singh, ed.). Van Nostrand Reinhold, New York, Chapter **8**: 251-307.

**Brüser, T., Lens, P. und Trüper, H.G.** (2000). The biological sulfur cycle. *In* Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution. (P. Lens & L. Hulshoff Pol, eds.). IWA Publishing, London, 47-86.

**Cort, J. R., Mariappan, S. V., Kim, C. Y., Park, M. S., et al.** (2001). Solution structure of *Pyrobaculum aerophilum* DsrC, an archaeal homologue of the gamma subunit of dissimilatory sulfite reductase. *Eur J Biochem* **268**(22): 5842-5850.

**Cort, J. R., Selan, U., Schulte, A., Grimm, F., et al.** (2008). *Allochromatium 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**(3): 692-707.

**Creighton, T. E.** (1988). Disulphide bonds and protein stability. *Bioessays* **8**(2): 57-63.

**Cupp-Vickery, J. R., Silberg, J. J., Ta, D. T. und Vickery, L. E.** (2004). Crystal structure of IscA, an iron-sulfur cluster assembly protein from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **338**(1): 127-137.

- Dagert, M. und Ehrlich, S. D.** (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**(1): 23-28.
- Dahl, C.** (2008). Inorganic sulfur compounds as electron donors in phototrophic sulfur bacteria. In *Advances in photosynthesis and respiration* (Govindjee, series editor) Sulfur metabolism in phototrophic organisms. (R. Hell, C. Dahl, D. Knaff & T. Leustek, eds.). Springer Verlag, Dordrecht, **27**: 289-317.
- Dahl, C.** (1996). Insertional gene inactivation in a phototrophic sulphur bacterium: APS-reductase-deficient mutants of *Chromatium vinosum*. *Microbiology* **142** ( Pt **12**): 3363-3372.
- Dahl, C.** (2000). Schwefelverbindungen als Elektronendonatoren für die Photosynthese anoxygener phototropher Bakterien. *BIOspektrum* **4**: 263-266.
- Dahl, C., Engels, S., Pott-Sperling, A. S., Schulte, A., et al.** (2005). Novel genes of the *dsr* gene cluster and evidence for close interaction of Dsr proteins during sulfur oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *J Bacteriol* **187**(4): 1392-1404.
- Dahl, C. und Prange, A.** (2006). Bacterial sulfur globules: Occurrence, structure and metabolism. In *Microbiology Monographs* (1) Inclusions in Prokaryotes. (J. M. Shively, ed.). Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 21-51.
- Dahl, C., Prange, A. und Steudel, R.** (2002). Metabolism of natural polymeric sulfur compounds. In *Biopolymers*. (A. Steinbüchel, ed.). Wiley-VCH, Weinheim, **9**: 35-62.
- Dahl, C., Schulte, A. und Shin, D. H.** (2007). Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of DsrEFH from *Allochromatium vinosum*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **63**(Pt 10): 890-892.
- Darby, N. und Creighton, T. E.** (1997). Probing protein folding and stability using disulfide bonds. *Mol Biotechnol* **7**(1): 57-77.
- Debussche, L., Thibaut, D., Cameron, B., Crouzet, J., et al.** (1990). Purification and characterization of cobyrinic acid a,c-diamide synthase from *Pseudomonas denitrificans*. *J Bacteriol* **172**(11): 6239-6244.
- Fabianek, R. A., Hennecke, H. und Thony-Meyer, L.** (2000). Periplasmic protein thiol:disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **24**(3): 303-316.
- Fekkes, P. und Driessen, A. J.** (1999). Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(1): 161-173.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., et al.** (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**(5223): 496-512.

- Franz, B., Lichtenberg, H., Hormes, J., Modrow, H., et al.** (2007). Utilization of solid "elemental" sulfur by the phototrophic purple sulfur bacterium *Allochrochromatium vinosum*: a sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy study. *Microbiology* **153**(Pt 4): 1268-1274.
- Friedrich, C. G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A., et al.** (2001). Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl Environ Microbiol* **67**(7): 2873-2882.
- Frigaard, N. U. und Dahl, C.** (2009). Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *Adv Microb Physiol* **54**: 103-200.
- Fuchs, G.** (2006). Allgemeine Mikrobiologie. Begründet von Hans G. Schlegel. 8 Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, Kap. **14**: 415-416.
- Getz, E. B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R., et al.** (1999). A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Anal Biochem* **273**(1): 73-80.
- Gilbert, H.F.** (1994). Protein folding. (R. Pain, eds.). IRL Press Ltd, Oxford, 104-136.
- Gill, S. C. und von Hippel, P. H.** (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**(2): 319-326.
- Grimm, F., Franz, B. und Dahl, C.** (2008). Thiosulfate and sulfur oxidation in purple sulfur bacteria. In *Microbial sulfur metabolism*. (C. Dahl & C.G. Friedrich, eds.). Springer Verlag, Heidelberg Berlin, 101-116.
- Hageage, G. J., Jr., Eanes, E. D. und Gherna, R. L.** (1970). X-ray diffraction studies of the sulfur globules accumulated by *Chromatium* species. *J Bacteriol* **101**(2): 464-469.
- Hagen, W. R., Silva, P. J., Amorim, M. A., Hagedoorn, P. L., et al.** (2000). Novel structure and redox chemistry of the prosthetic groups of the iron-sulfur flavoprotein sulfide dehydrogenase from *Pyrococcus furiosus*; evidence for a [2Fe-2S] cluster with Asp(Cys)<sub>3</sub> ligands. *J Biol Inorg Chem* **5**(4): 527-534.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.
- Heiden, S., Hedderich, R., Setzke, E. und Thauer, R. K.** (1994). Purification of a two-subunit cytochrome-b-containing heterodisulfide reductase from methanol-grown *Methanosarcina barkeri*. *Eur J Biochem* **221**(2): 855-861.
- Hensen, D., Sperling, D., Trüper, H. G., Brune, D. C., et al.** (2006). Thiosulphate oxidation in the phototrophic sulphur bacterium *Allochrochromatium vinosum*. *Mol Microbiol* **62**(3): 794-810.

- Hipp, W. M., Pott, A. S., Thum-Schmitz, N., Faath, I., et al.** (1997). Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes. *Microbiology* **143** ( Pt 9): 2891-2902.
- Holmgren, A.** (1984). Enzymatic reduction-oxidation of protein disulfides by thioredoxin. *Methods Enzymol* **107**: 295-300.
- Holmgren, A.** (1985). Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* **54**: 237-271.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K., et al.** (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**(1): 61-68.
- Hwang, C., Sinskey, A. J. und Lodish, H. F.** (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* **257**(5076): 1496-1502.
- Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A., et al.** (2006). Mechanistic insights into sulfur relay by multiple sulfur mediators involved in thiouridine biosynthesis at tRNA wobble positions. *Mol Cell* **21**(1): 97-108.
- Imhoff, J. F., Hiraishi, A. und Suling, J.** (2005). Anoxygenic Phototrophic Purple Bacteria. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd ed. (D.J Brenner, N.R. Krieg & J.T. Staley, eds.). Springer Verlag, New York, **2 The Proteobacteria part A**: 119-132.
- Imhoff, J. F., Suling, J. und Petri, R.** (1998). Phylogenetic relationships among the Chromatiaceae, their taxonomic reclassification and description of the new genera Allochromatium, Halochromatium, Isochromatium, Marichromatium, Thiococcus, Thiohalocapsa and Thermochromatium. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 4**: 1129-1143.
- Jacob, C., Giles, G. I., Giles, N. M. und Sies, H.** (2003). Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**(39): 4742-4758.
- Jongsareejit, B., Rahman, R. N., Fujiwara, S. und Imanaka, T.** (1997). Gene cloning, sequencing and enzymatic properties of glutamate synthase from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus sp. KOD1. *Mol Gen Genet* **254**(6): 635-642.
- Kämpf, C. und Pfennig, N.** (1980). Capacity of Chromatiaceae for chemotrophic growth. Specific respiration rates of *Thiocystis violacea* and *Chromatium vinosum*. *Arch Microbiol* **127**: 125-135.
- Karkhoff-Schweizer, R. R., Bruschi, M. und Voordouw, G.** (1993). Expression of the gamma-subunit gene of desulfoviridin-type dissimilatory sulfite reductase and of the alpha- and beta-subunit genes is not coordinately regulated. *Eur J Biochem* **211**(3): 501-507.

**Klenk, H. P., Clayton, R. A., Tomb, J. F., White, O., et al.** (1997). The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**(6658): 364-370.

**Kondratieva, EN., Pfennig, N. und Trüper, H.G.** (1992). The Phototrophic Prokaryotes. *In* The Prokaryotes, 2nd ed. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. (A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K.H. Schleifer, eds.). Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 312-330.

**Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.

**Larsen, Lien, T. und Birkeland, N. K.** (2000). Characterization of the desulforubidin operons from *Desulfobacter vibrioformis* and *Desulfobulbus rhabdoformis*. *FEMS Microbiol Lett* **186**(1): 41-46.

**Lovelock, J. E.; Maggs, R.J. und Rasmussen, R.A.** (1972). Atmospheric Dimethyl Sulphide and the Natural Sulphur Cycle. *Nature* **237**: 452-453.

**Loy, A., Duller, S und Wagner, M.** (2008). Evolution and ecology of microbes dissimilating sulfur compounds: insights from siroheme sulfite reductase. *In* Microbial sulfur metabolism. (C. Dahl & C.G. Friedrich, eds.). Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, 46-59.

**Lübbe, Y. J., Youn, H. S., Timkovich, R. und 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 sulphur oxidation. *FEMS Microbiol Lett* **261**(2): 194-202.

**Mander, G. J., Weiss, M. S., Hedderich, R., Kahnt, J., et al.** (2005). X-ray structure of the gamma-subunit of a dissimilatory sulfite reductase: fixed and flexible C-terminal arms. *FEBS Lett* **579**(21): 4600-4604.

**Maroulis, P. J. und Bandy, A. R.** (1977). Estimate of the Contribution of Biologically Produced Dimethyl Sulfide to the Global Sulfur Cycle. *Science* **196**(4290): 647-648.

**Molitor, M., Dahl, C., Molitor, I., Schafer, U., et al.** (1998). A dissimilatory sirohaem-sulfite-reductase-type protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum*. *Microbiology* **144** ( Pt 2): 529-541.

**Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., et al.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.

**Musmann, M., Richter, M., Lombardot, T., Meyerdierks, A., et al.** (2005). Clustered genes related to sulfate respiration in uncultured prokaryotes support the theory of their concomitant horizontal transfer. *J Bacteriol* **187**(20): 7126-7137.

---

**Oliveira, T. F., Vorrhein, C., Matias, P. M., Venceslau, S. S., et al.** (2008). The crystal structure of *Desulfovibrio vulgaris* dissimilatory sulfite reductase bound to DsrC provides novel insights into the mechanism of sulfate respiration. *J Biol Chem* **283**(49): 34141-34149.

**Pattaragulwanit, K., Brune, D. C., Trüper, H. G. und Dahl, C.** (1998). Molecular genetic evidence for extracytoplasmic localization of sulfur globules in *Chromatium vinosum*. *Arch Microbiol* **169**(5): 434-444.

**Pattaragulwanit, K. und Dahl, C.** (1995). Development of a genetic system for a purple sulfur bacterium: conjugative plasmid transfer in *Chromatium vinosum*. *Arch Microbiol* **164**: 217-222.

**Pfennig, N. und Trüper, H.G.** (1989). Anoxygenic phototrophic bacteria. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig & J.G. Holt, eds.). Williams and Wilkins, Baltimore, Hong Kong, London, Sidney, **3**: 1635-1639.

**Pierik, A. J., Duyvis, M. G., van Helvoort, J. M., Wolbert, R. B., et al.** (1992). The third subunit of desulfovirdin-type dissimilatory sulfite reductases. *Eur J Biochem* **205**(1): 111-115.

**Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. und Belfrage, G.** (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**(5536): 598-599.

**Pott, A. S. und Dahl, C.** (1998). Sirohaem sulfite reductase and other proteins encoded by genes at the *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiology* **144** ( Pt 7): 1881-1894.

**Pott-Sperling, A. S.** (2000). Das *dsr*-Operon von *Allochromatium vinosum*: molekularbiologische Charakterisierung der Gene für die Schwefeloxidation. Dissertation Friedrich-Wilhelm- Universität Bonn.

**Prange, A., Arzberger, I., Engemann, C., Modrow, H., et al.** (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**(2-3): 446-454.

**Prange, A., Engelhardt, H., Truper, H. G. und 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**(2-3): 165-174.

**Prinz, W. A., Aslund, F., Holmgren, A. und Beckwith, J.** (1997). The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem* **272**(25): 15661-15667.

**Reinartz, M., Tschape, J., Bruser, T., Trüper, H. G., et al.** (1998). Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch Microbiol* **170**(1): 59-68.

- Reynolds, R., Bermudez-Cruz, R. M. und Chamberlin, M. J.** (1992). Parameters affecting transcription termination by *Escherichia coli* RNA polymerase. I. Analysis of 13 rho-independent terminators. *J Mol Biol* **224**(1): 31-51.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., et al.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839): 487-491.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., et al.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**(4732): 1350-1354.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual* 2 nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory., Cold Spring Harbor, N.Y,
- Sanchez, O., Ferrera, I., Dahl, C. und Mas, J.** (2001). In vivo role of adenosine-5'-phosphosulfate reductase in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Arch Microbiol* **176**(4): 301-305.
- Sander, J.** (2005). Biochemische, molekularbiologische und bioinformatische Untersuchungen zum DsrMKJOP-Komplex von *Allochromatium vinosum*. Dissertation Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn
- Sander, J., Engels-Schwarzlose, S. und Dahl, C.** (2006). Importance of the DsrMKJOP complex for sulfur oxidation in *Allochromatium vinosum* and phylogenetic analysis of related complexes in other prokaryotes. *Arch Microbiol* **186**(5): 357-366.
- Schedel, M. und Trüper, H.G.** (1980). Anaerobic oxidation of thiosulfate and elemental sulfur in *Thiobacillus denitrificans*. *Arch Microbiol* **124**: 205-210.
- Schedel, M., Vanselow, M., Trüper, H.G.** (1979). Siroheme sulfite reductase isolated from *Chromatium vinosum*. *Arch Microbiol* **121**: 29-36.
- Schiffer, A., Parey, K., Warkentin, E., Diederichs, K., et al.** (2008). Structure of the dissimilatory sulfite reductase from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *J Mol Biol* **379**(5): 1063-1074.
- Schulte, A.** (2005). Biochemische und strukturelle Untersuchungen der Proteine DsrE, DsrF, DsrH und DsrC aus *Allochromatium vinosum*. Dissertation Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn
- Schwarz, S.** (2001). Rhodanese und Thiosulfatreduktase im phototrophen Schwefelbakterium *Allochromatium vinosum*. Dissertation Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn.
- Scott, A. I. und Roessner, C. A.** (2002). Biosynthesis of cobalamin (vitamin B(12)). *Biochem Soc Trans* **30**(4): 613-620.

**Steuber, J., Arendsen, A. F., Hagen, W. R. und Kroneck, P. M.** (1995). Molecular properties of the dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* (Essex) and comparison with the enzyme from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *Eur J Biochem* **233**(3): 873-879.

**Stuedel, R.** (1996). Das gelbe Element und seine erstaunliche Vielseitigkeit. *Chemie unserer Zeit* **30**: 226-234.

**Stuedel, R.** (2000). The Chemical Sulfur Cycle. *In* Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution. (P. Lens & L. Hulshoff Pol, eds.). Portland Press, Essex, Chapter **1**: 1-32.

**Stuedel, R., Holdt, G., Visscher, P.T., van Gernerden, H.** (1990). Search for polythionates in cultures of *Chromatium vinosum* after sulfide incubation. *Arch Microbiol* **153**: 432-437.

**Stryer, L.** (1994). Biochemie. Die Enzyme: eine Einführung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, Kapitel **8**: 201.

**Studier, F. W. und Moffatt, B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**(1): 113-130.

**Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W.** (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60-89.

**Thauer, R. K.** (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology* **144 ( Pt 9)**: 2377-2406.

**Trüper, H.G.** (1984). Phototrophic bacteria and their sulfur metabolism. *In* Sulfur, its Significance for Chemistry, for the Geo-,Bio-and Cosmosphere and Technology. (Studies in Inorganic Chemistry 5). (A. Müller & B. Krebs, eds.). Elsevier, Amsterdam, New York, 367-382.

**Trüper, H. G. und Hathaway, J. C.** (1967). Orthorhombic sulphur formed by photosynthetic sulphur bacteria. *Nature* **215**(5099): 435-436.

**Wächtershäuser, G.** (2002). Discussing the origin of life. *Science* **298**(5594): 747-749; author reply 747-749.

**Zhao, L. J., Zhang, Q. X. und Padmanabhan, R.** (1993). Polymerase chain reaction-based point mutagenesis protocol. *Methods Enzymol* **217**: 218-227.

**Zheng, M., Aslund, F. und Storz, G.** (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**(5357): 1718-1721.

## Veröffentlichung

### Artikel

**Cort, J.R., Selan, U., Schulte, A., Grimm, F., Kennedy, M.A. und Dahl, D.** 2008. *Allochromatium 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.

## **Danksagung**

Frau Prof. Christiane Dahl danke ich für die Überlassung des Themas, ihre Diskussionsbereitschaft und die vielen Ideen zu neuen Experimenten.

Herrn Prof. Jobst Klemme danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. J. Cort danke ich für seine Kooperationsbereitschaft und die von ihm durchgeführten NMR spektroskopischen Untersuchungen zu den mutierten DsrC Proteinen am Institut für Umwelt und molekulare Wissenschaften in Richland (Washington)

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie und insbesondere der AG Dahl danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Frau Priv.Doiz. Dr. Gerhild van Echten-Deckert und Herrn Prof. Dr. Lukas Schreiber möchte ich für die freundliche Einwilligung zur Mitwirkung am Promotionsverfahren danken.

Zudem danke ich Frau Priv. Doiz. Dr. Gerhild van Echten-Deckert für die freundliche Motivierung und Anteilnahme.

Ein Dankeschön an Frau Mechthilde Dossena, die mir oft Mut gemacht hat.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem Vater für seine Unterstützung und liebevolle Geduld ohne die ich niemals soweit gekommen wäre.

Nicht zuletzt ein Gedanke an meine verstorbene Mutter.

Meinem Freund Gerald danke ich ganz herzlich für die liebevolle Anteilnahme während der Endphase meiner Arbeit.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

**Bonn, Oktober 2009**