



# Analyse von periplasmatischen Schwefeltransferasen aus *Allochromatium vinosum*

## Dissertation

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

vorgelegt von  
**Jeanette Latus**  
aus Leobschütz  
Bonn 2020



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

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

Tag der Promotion: 27.08.2020

Erscheinungsjahr: 2021





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>11</b>
1.1	Die Bedeutung des mikrobiellen Schwefelkreislaufes . . . . .	11
1.2	Schwefeltransferasen („Rhodanesen“) . . . . .	12
1.3	<i>Allochromatium vinosum</i> und die dissimilatorische Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen . . . . .	14
1.3.1	Oxidation von Sulfid und Polysulfiden . . . . .	16
1.3.2	Oxidation von Thiosulfat . . . . .	16
1.3.3	Die Verwertung des Elementarschwefels und dessen Oxidation zu Sulfit . . . . .	18
1.3.4	Die Oxidation von Sulfit . . . . .	19
1.3.5	Mögliche Aufgaben von periplasmatischen Schwefeltransferasen . . . . .	20
1.4	Zielsetzung der Arbeit . . . . .	21
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1	Chemikalien und Materialien . . . . .	23
2.1.1	Chemikalien . . . . .	23
2.1.2	Enzyme . . . . .	23
2.1.3	Kits . . . . .	24
2.1.4	Materialien . . . . .	24
2.1.5	Software und Online-Programme . . . . .	25
2.2	Organismen, Oligonukleotide und Plasmide . . . . .	25
2.2.1	Organismen . . . . .	25
2.2.2	Oligonukleotide . . . . .	26
2.2.3	Plasmide . . . . .	28
2.3	Mikrobiologische Methoden . . . . .	30
2.3.1	Kultivierung und Lagerung von <i>Escherichia coli</i> . . . . .	30
2.3.2	Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen . . . . .	31
2.3.3	Heterologe Überproduktion von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i> . . . . .	32
2.3.4	Kultivierung von <i>Allochromatium vinosum</i> . . . . .	32
2.3.5	Kultivierung von <i>Alc. vinosum</i> in Anwesenheit von reduzierten Schwefelverbindungen . . . . .	34
2.4	Analytische Bestimmung der Konzentrationen von Schwefelverbindungen . . . . .	35
2.4.1	Bestimmung des intrazellulären Schwefels . . . . .	35
2.4.2	Bestimmung von Sulfat . . . . .	35
2.4.3	Bestimmung von Sulfit . . . . .	36
2.4.4	Bestimmung von Thiosulfat . . . . .	36
2.4.5	Bestimmung von Tetrathionat . . . . .	36

---

2.4.6	Bestimmung von Sulfid . . . . .	37
2.5	Molekularbiologische Methoden . . . . .	37
2.5.1	Isolierung von DNA und RNA . . . . .	37
2.5.1.1	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Alc. vinosum</i> . . . . .	37
2.5.1.2	Isolierung chromosomaler DNA von <i>E. coli</i> . . . . .	38
2.5.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA und Reinigung von DNA . . . . .	38
2.5.1.4	Isolierung von RNA aus <i>Alc. vinosum</i> . . . . .	38
2.5.1.5	Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren . . . . .	39
2.5.2	Amplifizierungen mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) . . . . .	39
2.5.2.1	Standard PCR . . . . .	39
2.5.2.2	Kolonie PCR . . . . .	40
2.5.2.3	Digoxigenin-Markierung von DNA mittels PCR . . . . .	40
2.5.2.4	Zielgerichtete Mutagenese durch „gene SOEING“ . . . . .	40
2.5.2.5	cDNA-Synthese . . . . .	42
2.5.2.6	Quantitative Real-time PCR . . . . .	42
2.5.3	DNA-Transfer . . . . .	43
2.5.3.1	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen . . . . .	43
2.5.3.2	DNA-Transfer von <i>E. coli</i> nach <i>Alc. vinosum</i> . . . . .	43
2.5.4	Enzymatische DNA-Modifizierungen . . . . .	44
2.5.4.1	Restriktion von DNA . . . . .	44
2.5.4.2	Alkalische Phosphatase . . . . .	44
2.5.4.3	Ligation . . . . .	44
2.5.5	DNA Sequenzierung . . . . .	44
2.5.6	DNA-DNA-Hybridisierung . . . . .	44
2.5.7	Agarosegelelektrophorese und Färbung von DNA . . . . .	45
2.6	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	46
2.6.1	Zellyse . . . . .	46
2.6.2	Ultrazentrifugation . . . . .	46
2.6.3	Solubilisierung von Membranproteinen . . . . .	46
2.6.4	Aufreinigung rekombinanter Proteine . . . . .	46
2.6.4.1	His-Tag Aufreinigung . . . . .	46
2.6.4.2	Strep-Tag Aufreinigung . . . . .	47
2.6.5	Entsalzung von Protein-Lösungen . . . . .	47
2.6.5.1	Dialyse . . . . .	47
2.6.5.2	Gelfiltration . . . . .	47
2.6.6	Quantifizierung von Proteinen . . . . .	47
2.6.6.1	Fällung von Proteinen mittels Aceton . . . . .	47
2.6.6.2	Quantifizierung nach Bradford . . . . .	48
2.6.6.3	Quantifizierung mit BCA . . . . .	48
2.6.7	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen . . . . .	48
2.7	Detektierung der Schwefelbindung . . . . .	48
2.7.1	Detektierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie . . . . .	48

---

2.7.2	Detektierung mittels 1,5-I-AEDANS . . . . .	49
2.8	Bestimmung enzymatischer Reaktionen . . . . .	50
2.8.1	Bestimmung der Aktivitäten von Fusionsproteinen . . . . .	50
2.8.2	Bestimmung der Thiosulfat:Cyanid- bzw. Glutathionpersulfid:Cyanid- Schwefeltransferaseaktivität . . . . .	50
2.8.3	Schwefeltransfer von Polysulfiden zu Cyanid . . . . .	51
2.8.4	Die Aktivitätsmessung des rekonstituierten Sox-Systems . . . . .	51
2.9	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen . . . . .	52
2.9.1	SDS-Page . . . . .	52
2.9.2	Native-Page . . . . .	53
2.9.3	Western-Blot . . . . .	53
2.9.4	Visualisierung von Proteinen . . . . .	53
2.9.4.1	Anfärbung von Proteinen auf SDS-Gelen . . . . .	53
2.9.4.2	Protein-Antikörper-Konjugatfärbung . . . . .	54
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
3.1	Untersuchungen zur putativen Schwefeltransferase Alvin_3028 . . . . .	55
3.1.1	Bioinformatische Analysen zu Alvin_3028 . . . . .	56
3.1.2	Analyse der transkriptionellen Regulation von Alvin_3028 . . . . .	58
3.1.3	Klonierung, heterologe Produktion und Aufreinigung des rekombinanten Alvin_3028 . . . . .	60
3.1.4	Untersuchung der Schwefeltransferase-Aktivität von Alvin_3028 . . . . .	61
3.1.5	Die zelluläre Orientierung des C-Terminus . . . . .	61
3.1.5.1	Konstruktion der „Reportergenfusions-Plasmide“ . . . . .	62
3.1.5.2	Alkalische Phosphatase- und Glucuronidase-Aktivitäten der Fusionsproteine und Kontrollen . . . . .	63
3.2	Untersuchungen zur putativen Schwefeltransferase Alvin_0258 . . . . .	64
3.2.1	Bioinformatische Analysen zu Alvin_0258 . . . . .	65
3.2.2	Analyse der transkriptionellen Regulation von Alvin_0258 . . . . .	66
3.2.3	Klonierung, heterologe Produktion und Aufreinigung des rekombinanten Alvin_0258 . . . . .	69
3.2.4	Schwefeltransferase-Aktivität von Alvin_0258 . . . . .	69
3.2.5	Schwefeltransferase-Aktivität mit alternativen Substraten . . . . .	71
3.3	Untersuchungen zum Sox-Multienzymkomplex . . . . .	72
3.3.1	Transkriptionelle Analyse des <i>soxXAKL</i> Genclusters aus <i>Alc. vinosum</i> . . . . .	72
3.3.2	Physiologische Untersuchung der <i>Alc. vinosum</i> $\Delta$ <i>soxK</i> Mutante . . . . .	73
3.3.3	<i>In vitro</i> Analysen des vollständig rekonstituierten Sox Systems aus <i>Alc. vinosum</i> . . . . .	74
3.3.4	Strukturelle Auswirkungen der Sulfid-Behandlung auf SoxYZ . . . . .	75
3.3.5	Oligomerisierung von SoxYZ . . . . .	78
3.3.6	Der Einfluss der SoxYZ-Oligomerisierung auf die Aktivität des Sox Systems . . . . .	80
3.4	Untersuchungen zum Rhodanese-ähnlichen Protein SoxL . . . . .	81
3.4.1	Bioinformatische Analysen der Proteinsequenz von SoxL . . . . .	82
3.4.2	Analyse der transkriptionellen Regulation von <i>soxL</i> . . . . .	83

3.4.3	Herstellung rekombinanter SoxL Varianten . . . . .	85
3.4.4	Analyse der Schwefelbindefähigkeit von SoxL . . . . .	86
3.4.5	Bildung von Polysulfiden durch SoxL in Anwesenheit von Sulfid . . . . .	87
3.4.6	Strukturelle Analysen von SoxL mittels 1,5-I-AEDANS . . . . .	90
3.5	Der Einfluss von SoxL auf das Sox System . . . . .	92
3.5.1	Interaktionsstudien von SoxL und SoxYZ . . . . .	93
3.5.2	Schwefeltransfer von SoxYZ zu SoxL . . . . .	95
3.5.3	Vollständige Rekonstitution des Sox Systems mit SoxL und SoxL-Varianten . . . . .	96
3.6	Physiologische Untersuchung der Schwefeltransferase-defizienten <i>Alc. vinosum</i> Mutanten . . . . .	103
3.6.1	Herstellung und Untersuchung der „In Frame“-Schwefeltransferase-defizienten Mutanten . . . . .	104
3.6.2	Rhodanese-Aktivität der <i>Alc. vinosum</i> Deletionsmutanten . . . . .	104
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>107</b>
4.1	Die membrangebundene Schwefeltransferase Alvin_3028 . . . . .	107
4.2	Die periplasmatische Schwefeltransferase Alvin_0258 . . . . .	111
4.3	Die Rolle von SoxK auf die Funktion des Sox Systems . . . . .	114
4.4	Struktur und Funktionalität von SoxYZ - Das Schlüsselenzym des Sox Systems . . . . .	115
4.5	Die potentielle Schwefeltransferase SoxL und deren Einfluss auf das Sox System . . . . .	121
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>135</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>136</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>149</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>151</b>

# Abkürzungen

1,5-I-ADAENS	<i>N</i> -(iodoacetyl)- <i>N</i> '-(5-sulfo-1-naphtyl)-ethylenediamine
Ap	Ampicillin
APS	Ammonium Persulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
(k)Da	(Kilo-)Dalton
ddH <sub>2</sub> O	Demineralisiertes deionisiertes Wasser
dH <sub>2</sub> O	Demineralisiertes Wasser
dig	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	D-Nucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>g</i>	Gravitationskonstante
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
M	molar
kb	Kilobasenpaare
Km	Kanamycin
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic acid
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase Chain Reaction
Rif	Rifampicin
RNase	Ribonuclease
rpm	Rounds per minute
Sm	Streptomycin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
qRT-PCR	Quantitative reverse transcriptase PCR
TCEP	Tris (2-carboxyethyl) phosphine
TEMED	Tetramethylendiamin
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Bedeutung des mikrobiellen Schwefelkreislaufes

Am globalen Schwefelkreislauf sind mitunter Mikroorganismen beteiligt, die metabolisch sowie phylogenetisch eine hohe Diversität aufweisen. Ozeane gelten als Hauptreservoir von Schwefel, der dort hauptsächlich in Form von gelöstem Sulfat und sedimentären Mineralien (Kalziumsulfat, Pyrit) vorkommt und in unterschiedlichen anorganischen Verbindungen und Oxidationsstufen vorliegt. Sulfat (+6) ist die stabilste Form. Reduzierte, anorganische Schwefelverbindungen mit Oxidationsstufen -2 (z.B. Sulfid, Thiosulfat) und 0 (elementarer Schwefel) sind meist unter anoxischen Bedingungen zu finden. Mikroorganismen reduzieren in einem energieaufwendigen, assimilatorischen Stoffwechsel Sulfat zu Sulfid, um organische Verbindungen herzustellen. Diese schwefelhaltigen Verbindungen sind vor allem für die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von Proteinen notwendig, da z.B. durch die Aminosäure Cystein sowohl wichtige Disulfidbindungen und folglich Tertiärstrukturen der Proteine ausgebildet werden können, als auch die Bindung von Sulfanschwefel erfolgen kann. Die Assimilation von Schwefel ist auch für den Aufbau von Coenzymen (z.B. Coenzym A, Biotin, Thiamin), und für die Ausbildung von Eisen-Schwefel-Clustern in prosthetischen Gruppen wichtig und vor allem höhere Lebewesen sind von der Produktion dieser Verbindungen abhängig (Brüser et al., 2000; Dahl et al., 2002; Kessler, 2006).

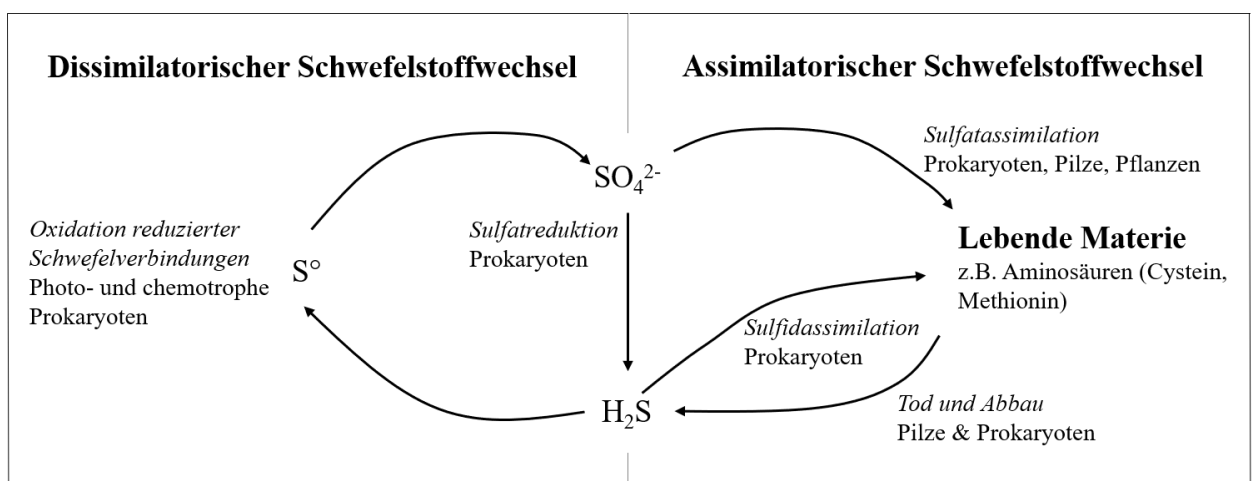


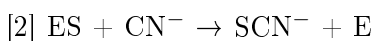
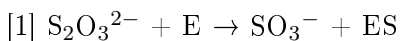
Abbildung 1.1: Vereinfachte Übersicht des assimilatorischen und dissimilatorischen Schwefelkreislaufes in der Natur (modifiziert nach Dahl et al. (2002)).

Weiterhin sind viele Bakterien sowie Archaeen in der Lage, Schwefel als Energiequelle zu nutzen, um einen dissimilatorischen Stoffwechsel zu betreiben, wodurch der natürliche Schwefelkreislauf geschlossen wird. Im Falle von Sulfat-reduzierenden Bakterien dienen organische Verbindungen oder auch molekularer Wasserstoff als Elektronendonoren für eine Atmung mit Sulfat als Elektronenak-

zeptor. Dies ist notwendig, da dieser Stoffwechselweg unter strikt anaeroben Bedingungen abläuft. Im Gegensatz dazu, können Schwefel-oxidierende Mikroorganismen reduzierte, anorganische Schwefelverbindungen, wie Sulfid und elementaren Schwefel, als Elektronendonoren nutzen, um autotroph  $\text{CO}_2$  zu fixieren. Die frei gewordenen Elektronen werden dabei entweder in die Atmungskette eingeschleust (bei chemolithotrophen Bakterien und Archaeen) oder können bei phototrophen Bakterien für die anoxygene Photosynthese genutzt werden (**Abb. 1.1.**). Bekannte Vertreter der Bakterien, die während der anoxygenen Photosynthese Schwefel oxidieren, sind die grünen Schwefelbakterien (*Chlorobiaceae*) und die Schwefelpurpurbakterien (*Chromatiaceae* und *Ectothiorhodospiraceae*), zu denen die Modellorganismen *Chlorobaculum tepidum* und *Allochromatium vinosum* gehören. Diese bilden bei der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen, Schwefelkugeln als Zwischenprodukte aus, die sie extra- bzw. intrazellulär lagern. Der zwischengelagerte Schwefel wird dann weiter zu Sulfat oxidiert. Dieses wird schließlich aus den Zellen entlassen und kann Sulfat-reduzierenden Bakterien als Elektronenakzeptor dienen.

## 1.2 Schwefeltransferasen („Rhodanesen“)

Im Jahre 1933 berichtete Lang erstmals über ein Enzym, das in bestimmten Säugetiergeweben in der Lage ist, eine Reaktion zwischen Thiosulfat und Cyanid zu katalysieren, wobei Thiocyanat (SCN-Rhodanid) und Sulfit gebildet werden (Lang, 1933). Der Name „Rhodanese“ leitet sich von dem Produkt und der enzymatisch vermittelten Reaktion ab, wobei darauf geachtet werden sollte, dass es sich bei diesen Enzymen um Thiosulfat:Cyanid-Schwefeltransferasen (TST) handelt. Meist in Form eines „Ping-Pong“-Mechanismus katalysieren diese *in vitro* einen Schwefeltransfer von Thiosulfat zu Cyanid, wobei dieser in zwei Schritten erfolgt: Zunächst wird der Schwefel des Thiosulfats an ein katalytisches Cystein der Schwefeltransferase gebunden, wodurch Sulfit entsteht. Durch eine nukleophile Reaktion des Schwefels ( $\text{S}^\circ$ ) mit dem Cyanid wird im darauffolgenden Schritt Thiocyanat gebildet, wodurch das Cystein regeneriert wird und folglich das Enzym unverändert aus der Reaktion hervorgeht (Horowitz and Criscimagna, 1983; Pagani et al., 2000; Cipollone et al., 2004). Alternativ können einige Rhodanesen den Sulfanschwefel von 3-Mercaptopyruvat auf Cyanid übertragen und werden somit 3-Mercaptopyruvat:Cyanid Schwefeltransferasen (MSTs) genannt. Weitere thiophile Akzeptoren können neben Cyanid auch Lipoat oder Thioredoxin sein, da sie eine spezifische Interaktion mit diversen Rhodanesen aufwiesen (Ray et al., 2000; Cianci et al., 2000).



Die erste charakterisierte Rhodanese ist die mitochondriale TST aus dem Rind (*Bos taurus*) (Sörbo, 1953; Westley et al., 1983; Nandi et al., 2000). Analysen der Kristallstrukturen dieses Enzyms sowie von RhdA aus *Azotobacter vinelandii* (Ploegman et al., 1978) haben ergeben, dass beide Proteine aus zwei identisch gefalteten Domänen bestehen, den sogenannten Rhodanese-Domänen, die untereinander eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen. Diese Tandemstruktur lässt vermuten, dass sich Rhodanesen evolutionär divergent aus einem einzigen Vorgängerprotein entwickelt haben und die Sequenzähnlichkeit der beiden Domänen durch Genduplikation zu erklären ist (Ploegman et al.,



1978). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nur die C-terminale Rhodanesedomäne ein katalytisches Cystein aufweist. Dieses Cystein ist in der N-terminalen Domäne gegen eine Asparaginsäure ausgetauscht, sodass diese Domäne keinerlei Rhodaneseaktivität besitzt (Bordo and Bork, 2002). Auch strukturelle Analysen der TST aus *Escherichia coli*, GlpE, haben gezeigt, dass die N-terminale Rhodanesedomäne für die Katalyse keine Rolle spielt, da sie in GlpE fehlt (Ray et al., 2000; Spallarossa et al., 2001). Damit können Rhodanesen in zwei Gruppen eingeteilt werden: Tandemstruktur- und Einzeldomänen-Rhodanesen. Enzyme aus beiden Gruppen können *in vitro* als Schwefeltransferasen agieren (Spallarossa et al., 2001).

Allen als Schwefeltransferasen aktiven Rhodanesen sind hoch konservierte Motive gemeinsam:

MSTs: **CRXGX[R/T]**

TSTs: **CG[S/T]GVT**

X: irgendeine Aminosäure

Durch die Sequenzierung vollständiger Genome ist mittlerweile bekannt, dass Organismen aus allen drei evolutionären Reichen bzw. Stämmen (Eukaryoten, Bakterien, Archaeen) Proteine mit Rhodanesedomänen besitzen und in manchen dieser Organismen direkt mehrere Rhodanesen vorkommen (Hofmann et al., 1998; Bordo and Bork, 2002). So sind z.B. in *Allochromatium vinosum* neun Proteine mit Rhodanesedomänen gefunden worden, die cytoplasmatisch, periplasmatisch oder membrangebunden vorliegen (Weissgerber et al., 2011). Auch in anderen anoxygenen, phototrophen Schwefelbakterien wurde über Rhodanesen berichtet und deren Aktivität nachgewiesen (Brune, 1989).

Die biologische Bedeutung der meisten Schwefeltransferasen ist immer noch unbekannt, da davon ausgegangen werden kann, dass die Substrate *in vivo* nicht mit denen *in vitro* übereinstimmen (Nandi et al., 2000; Ray et al., 2000). Lange wurde angenommen, dass Rhodanesen für die Cyanidgiftung verantwortlich sind (Lang, 1933; Ray et al., 2000). Sie scheinen aber vor allem bei Schwefeltransfermechanismen eine Rolle zu spielen. Hier ist die Biosynthese von schwefelhaltigen Kofaktoren, Molybdopterin und Eisen-Schwefel-Clustern zu nennen (Kessler, 2006; Mueller, 2006). Im Folgenden werden einige Rhodanesen beschrieben, deren Funktion innerhalb des Schwefelstoffwechsels annäherungsweise bekannt ist bzw. nachgewiesen wurde.

Das periplasmatische PspE Protein aus *Escherichia coli* scheint bei dem Transfer von Schwefel involviert zu sein, der zur Reparatur schwefelhaltiger Cluster von Enzymen benötigt wird (Cheng et al., 2008). Eine weitere periplasmatische Rhodanese wurde im Cyanobakterium *Synechococcus* PCC 7942 gefunden. Hier fungiert sie als Substratbindeprotein bei der Beschaffung von Schwefelverbindungen. Das kodierende Gen befindet sich in der Nähe von schwefelregulierten Genen, deren Produkte für die Aufnahme von Sulfat wesentlich sind (Laudenbach et al., 1991).

Eine periplasmatische Schwefeltransferase aus *Wolinella succinogenes*, das Sud Protein, zeigte eine Polysulfid:Cyanid Schwefeltransferaseaktivität. Damit konnte verdeutlicht werden, dass einige Rhodanesen die Umsetzung anderer Substrate als Thiosulfat katalysieren können (Kreis-Kleinschmidt et al., 1995). Weiterhin wurde die Bedeutung der Polysulfid-Umsetzung für den Metabolismus nachgewiesen. Im Sud-Protein binden bis zu zehn Schwefelatome an das aktive Cystein<sub>109</sub>. Die Schwefelatome werden dann zu einer membranassoziierten Polysulfid-Reduktase transferiert (Klimmek et al.,

1998, 1999). Auch in *Aquifex aeolicus* wurde eine Schwefeltransferase, das SbdP Protein, gefunden, das eine kurze Polysulfidkette bindet und vermutlich als Vermittler zwischen den Schwefelkugeln und der Schwefel-Oxygenase-Reduktase bzw. der Schwefelreduktase fungiert (Aussignargues et al., 2012).

Die *Acidithiobacillus ferrooxidans* TSTs P15 und P16.2 zeigten, mit nur einer Rhodanesedomäne, die beschriebene Rhodaneseaktivität. Durch die Bestimmung ihrer mRNA-Expressionslevel, mittels Macroarrays, wurde eine Rolle während der Schwefeloxidation wahrscheinlich gemacht (Acosta et al., 2005). Proteom-Analysen detektierten eine hohe Menge von Rhodanese-ähnlichen Schwefeltransferasen (DESAMIL20\_1987 und DESAMIL20-2007) in *Desulfurella amilsii*, einem schwefelreduzierenden Bakterium, das mittels Schwefel-Disproportionierung wächst. Die Schwefeltransferasen waren nur unter Wachstumsbedingungen der Schwefel-Disproportionierung vorhanden und das Fehlen weiterer für diesen Prozess charakteristischer Proteine lässt vermuten, dass diese Proteine eine wesentliche Rolle bei diesem Vorgang spielen könnten. Weiterhin implizierten die Autoren, dass weitere Rhodanesen an der Schwefel- bzw. Polysulfid-Reduktion beteiligt sein könnten (Florentino et al., 2019).

Auch Transkriptomstudien an *Allochromatium vinosum* zeigten, dass Gene für mögliche Schwefeltransferasen, während der Schwefeloxidation, höher exprimiert werden (Weissgerber et al., 2013). Für zwei dieser Rhodanesen konnte die Funktion bestimmt werden. Deren kodierende Gene weisen, wie in vielen anderen Schwefeloxidierern, die das Dsr-System besitzen, eine typische Anordnung auf - *rhd-tusA-dsrE2*. Eine *rhd-tusA-dsrE2*-defiziente *Alc. vinosum* Mutante war nicht mehr in der Lage, Sulfid zu oxidieren und in Flüssigmedium nicht lebensfähig (Stockdreher et al. (2014)). Zusätzlich konnte ein aufwendiger Schwefeltransfermechanismus für diese Proteine nachgewiesen werden. Hier gehören die Schwefelakzeptoren zu Dsr-Proteinen, die an dissimilatorischen Prozessen im Cytoplasma beteiligt sind (s. 1.3.3).

Es lässt sich also zusammenfassen, dass Schwefeltransferasen sehr vielfältige Funktionen innerhalb des Schwefelstoffwechsels besitzen können, vor allem wenn es um den zellulären Transport und die Bereitstellung von Schwefel geht.

### 1.3 *Allochromatium vinosum* und die dissimilatorische Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen

*Allochromatium vinosum* besiedelt anoxische Zonen aquatischer Habitats, in denen zugleich Schwefelwasserstoff und Licht vorhanden sind. *Alc. vinosum* ist ein gram-negatives, stäbchenförmiges Gammaproteobakterium (Pfennig and Trüper, 1989; Imhoff et al., 1998). Es spielt für den globalen Schwefelzyklus eine wesentliche Rolle, da der von *Alc. vinosum* oxidierte Schwefel, in Form von Sulfat, erneut für Assimilations- bzw. Dissimilationsvorgänge bereit steht und auch mit Sulfid kontaminierte Standorte gereinigt werden können (Borkenstein and Fischer, 2006). Unter mikro- bzw. semiaeroben Bedingungen kann *Alc. vinosum* chemotroph wachsen, indem es im Dunkeln Sauerstoff als Endakzeptor verwendet (Kämpf and Pfennig, 1980; Dincturk et al., 2011). Seine bevorzugte Energiequelle ist aber das Licht. Dabei wächst *Alc. vinosum* entweder photolithoautotroph, indem es reduzierte Schwefelverbindungen (Sulfid, Polysulfide, Thiosulfat, Sulfit oder elementaren Schwefel) verwendet oder photoorganoheterotroph mit verschiedenen organischen Substraten, wie Format,

Acetat, Propionat, Fumarat, Succinat und Malat (Brune, 1989; Pfennig and Trüper, 1989; Weissgerber et al., 2011). Die Fixierung von CO<sub>2</sub> erfolgt dabei über den reduktivem Pentosephosphatweg (Brune, 1989; Weissgerber et al., 2011). Durch das Vorliegen einer vollständigen Genomsequenz sowie detaillierter, vergleichender Transkriptom-, Proteom- und Metabolomstudien ist *Alc. vinosum* mittlerweile zu einem Modellorganismus für den dissimilatorischen Schwefelmetabolismus in phototrophen Bakterien geworden (Pattaragulwanit and Dahl, 1995; Weissgerber et al., 2011, 2013, 2014a,b).

Die dissimilatorische Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen verläuft in *Alc. vinosum* in drei großen Schritten. Ein Überblick der Schwefeloxidation ist in **Abbildung 1.2.** zu sehen.

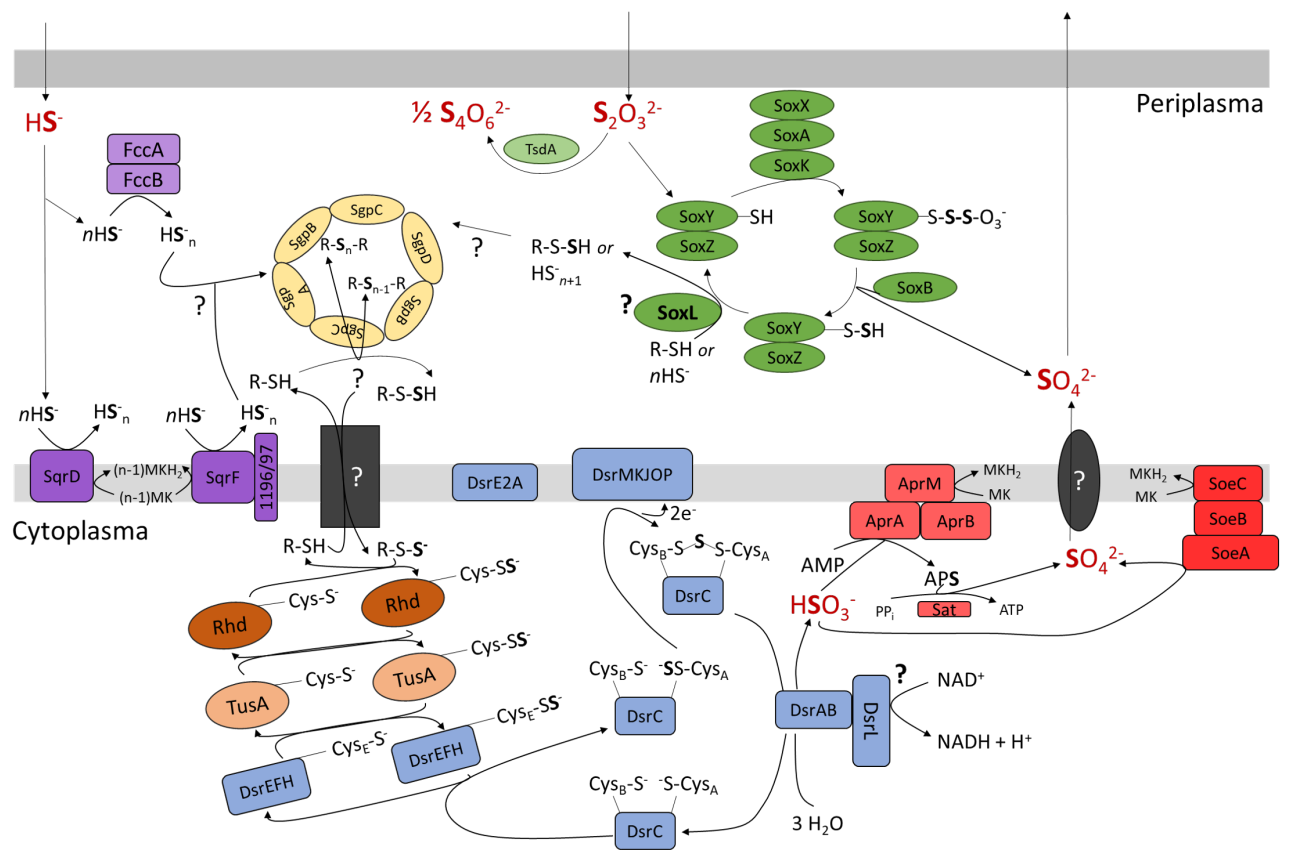


Abbildung 1.2: **Modell des dissimilatorischen Schwefelstoffwechsels in *Alc. vinosum*** (modifiziert nach Weissgerber et al. (2014a); Brito et al. (2015); Tanabe et al. (2019); Löffler et al. (2020)). FccAB: Flavocytochrom c; SqrD: Sulfid-Quinon-Reduktase; SqrF: FAD-abhängige Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktase; SgpA, SgpB, SgpC, SgpD: Schwefelkugelproteine; Rhd: cytoplasmatische Rhodanese (Rhd\_2599); TusA: Schwefel-Carrier-Protein; DsrEFH: cytoplasmatische Schwefeltransferase; DsrAB: Sirohäm-Sulfit-Reduktase; DsrL: Eisen-Schwefel-Flavoprotein; AprAB: Adenylylsulfat-Reduktase; AprM: hypothetisches Protein (Alvin\_1119); Sat: Sulfat-Adenylyltransferase; SoeA: Ankeruntereinheit der DMSO-Reduktase; SoeB: 4Fe-4S Ferredoxin-Eisen-Schwefel-Bindeprotein; SoeC: Molybdopterin-Oxidoreduktase; TsdA: Thiosulfat-Dehydrogenase; SoxXA: L-Cystein S-Thiosulfotransferase; SoxK: SoxXA-Bindeprotein; SoxB: S-Sulfosulanyl-L-Cystein Sulfohydrolase; SoxL: periplasmatische Schwefeltransferase

Während der Oxidation von Sulfid, Thiosulfat, Polysulfiden und elementarem Schwefel werden Schwefelkugeln als Zwischenprodukte im Periplasma akkumuliert. Der gespeicherte Schwefel wird anschließend im Cytoplasma zu Sulfit oxidiert und im abschließenden Schritt zum Endprodukt Sulfat umgesetzt (Dahl and Trüper, 1994).

### 1.3.1 Oxidation von Sulfid und Polysulfiden

Für die Oxidation von Sulfid könnten drei unterschiedliche Enzyme in Frage kommen. Das lösliche FccAB (Alvin\_1192 / 93) wäre hierfür ein möglicher Kandidat. Die Deletion von *fccAB* führte jedoch zu ähnlichen Sulfidoxidationsraten, wie bei der *Alc. vinosum* Wildtypkultur (Reinartz et al., 1998). Weiterhin könnten die membrangebundenen Sulfid:Chinon-Oxidoreduktasen SqrD (Alvin\_2145) und SqrF (Alvin\_1195) eine Rolle spielen. Für SqrD und SqrF konnte vorhergesagt werden, dass sie dem Periplasma zugewandt sind und die Deletion von *sqrF* behinderte die Bildung von Schwefelkugeln während des Wachstums auf hohen Sulfidkonzentrationen (Dahl et al. (2008); Weissgerber et al. (2013); Zigann & Dahl, unveröffentlichte Daten). Weiterhin weisen die Sequenzen dieser Proteine große Ähnlichkeiten zu der SQR aus *Rhodobacter capsulatus* auf, das als primäre Produkte Polysulfide ausbildet. Polysulfide wurden auch in *Alc. vinosum* während der Sulfidoxidation gefunden (Griesbeck et al., 2002; Franz et al., 2009) und könnten entweder spontan als Elementarschwefel, in Form von Schwefelkugeln, gespeichert oder enzymatisch zu diesem umgesetzt werden (Frigaard and Dahl, 2009). Sulfid könnte eventuell auch über den Sox-Multienzymkomplex oxidiert werden, da in *Rhodovulum sulfidophilum*, einem schwefelfreiem Purpurbakterium, dieser Komplex sowohl Thiosulfat sowie Sulfid umsetzt (Appia-Ayme et al., 2001). Allerdings kann dies zum jetzigen Zeitpunkt ausgeschlossen werden, da *Alc. vinosum* *soxY*- bzw. *soxB*-Deletionsmutanten Sulfidoxidationsraten aufwiesen, welche vergleichbar mit denen des Wildtyps waren (Hensen et al., 2006). Deswegen scheint die SQR das dominierende Enzym bei der Oxidation von Sulfid zu sein.

### 1.3.2 Oxidation von Thiosulfat

#### Thiosulfat-Oxidation durch die TsdA

Thiosulfat kann entweder über den Sox-Multienzymkomplex zu Sulfat oxidiert werden (Hensen et al., 2006) oder wird bei niedrigen pH-Werten durch die Thiosulfatdehydrogenase TsdA (Alvin\_1091) umgesetzt. Bei der TsdA handelt es sich um ein *c*-Typ Cytochrom, das zwei Thiosulfate zu Tetrathionat umwandelt, das nicht weiter verwertet wird (Hensen et al., 2006; Denkmann et al., 2012). Die Kristallstruktur zeigte, dass das Enzym zwei charakteristische *c*-Typ-Domänen (Klasse I) besitzt, die um zwei Häme gewunden sind. Das Häm 1 besitzt eine His/Cys Eisen-Koordination und bildet das aktive Zentrum innerhalb des Enzyms. Diese Form der Koordination ist unter den Prokaryoten selten, womit ein neuer Mechanismus der Thiosulfat-Oxidation aufgestellt werden konnte (Brito et al., 2015). Weiterhin wurde ersichtlich, dass die bei der Thiosulfat-Oxidation frei werdenden Elektronen *in vitro* auf HiPIP („high potential iron-sulfur protein“) übertragen werden, das wiederum Elektronen vom Cytochrom-*bc1*-Komplex auf das photosynthetische Reaktionszentrum transferieren kann. Ebenfalls möglich wäre eine direkte Elektronenübertragung von TsdA auf das Reaktionszentrum (**Abb. 1.3**). Auch unter chemolithoautotrophen Wachstumsbedingungen wäre es möglich, dass die Elektronen von TsdA über HiPIP auf die terminale Oxidase (*cbb3*-Oxidase)

übertragen werden könnten, um Energie zu gewinnen (Kurth et al., 2016; Kurth and Dahl, 2017).

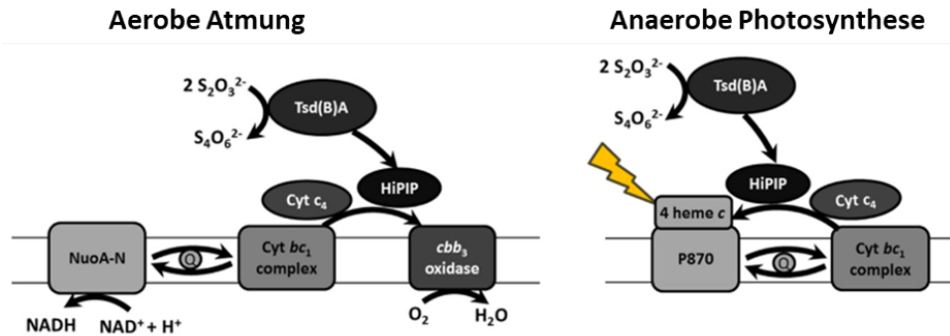


Abbildung 1.3: **Die Rolle der TsdA während des periplasmatischen Elektronentransfers bei der aeroben Atmung bzw. der anaeroben Photosynthese.** NuoA-N (Alvin\_2418–2430 + Alvin\_2412), Cytochrom-*bc*1-Komplex (Alvin\_0068–0070) und *cbb*3 Oxidase (Alvin\_0781–0784). *Alc. vinosum* kann chemolithotroph aerobe Atmung betreiben, wobei die Hauptenergie über anoxygene Photosynthese erlangt wird (modifiziert nach Kurth et al. (2016); Kurth and Dahl (2017))

### Thiosulfat-Oxidation mittels Sox-System

Unter neutralen Bedingungen wird Thiosulfat allerdings zunächst im Periplasma von SoxXAK (Alvin\_2168–70), einem *c*-Typ Cytochrom, oxidativ an SoxYZ (Alvin\_2111/Alvin\_2112) gebunden. Vermutlich stabilisiert dabei SoxK die Struktur von SoxXA, wie es auch für einen SoxXAK-Komplex aus *Chlorobaculum tepidum* beschrieben wurde (Ogawa et al., 2008). Verstärkt wird diese Vermutung, da eine Verbindungsschleife, welche SoxXA Proteine aus *Rhodovulum sulfidophilum* und *Paracoccus pantotrophus* besitzen, bei *Alc. vinosum* nicht vorhanden ist (Bamford et al., 2002). SoxYZ konnte bereits von Hensen et al. (2006) als Heterodimer (SoxY 12,7 kDa, SoxZ 11,2 kDa) aufgereinigt werden und es wurde experimentell nachgewiesen, dass Thiosulfat an einem hoch konservierten Cysteinrest, am C-Terminus von SoxY, gebunden wird. In *P. pantotrophus* ist dieser katalytische Peptidarm sehr beweglich und erlaubt dadurch eine effiziente Interaktion mit dem Substrat und den Komplexpartnern (Sauvé et al., 2007). Nach der Bindung des Thiosulfates an SoxYZ erfolgt die hydrolytische Spaltung durch SoxB (Alvin\_2167), wodurch Sulfat gebildet wird und ein Sulfanschwefel an SoxYZ verbleibt. Für das *P. pantotrophus* SoxB konnte gezeigt werden, dass es zwei Manganatome pro Monomer besitzt (Epel et al., 2005; Friedrich et al., 2005). Dies ist wahrscheinlich auch in *Alc. vinosum* der Fall. In *P. pantotrophus* wird im Anschluss an die hydrolytische Spaltung SoxYZ durch SoxCD regeneriert. Dabei katalysieren das Molybdoprotein SoxC und SoxD, ein Hybrid-Dihäm *c*-Typ Cytochrom, die Oxidation des verbliebenen Sulfanschwefels, welcher erneut durch SoxB hydrolytisch gespalten wird, wodurch ein zweites Sulfat freigesetzt wird und SoxYZ in einen neuen Zyklus übergehen kann (Friedrich et al., 2001; Zander et al., 2010). In *Alc. vinosum* ist SoxCD allerdings nicht vorhanden, wie auch in anderen Schwefeloxidierern, die Dsr Proteine besitzen (Gregersen et al., 2011). Stattdessen wird der Sulfanschwefel vermutlich durch SoxL (Alvin\_2171) (Welte et al., 2009) zu den Schwefelkugeln transportiert (**Abb. 1.4.**).

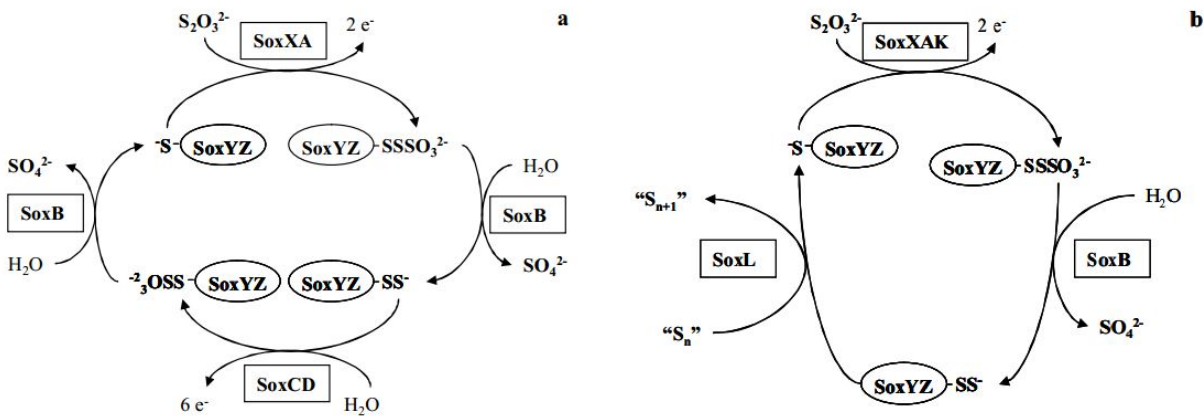


Abbildung 1.4: Modell des Sox-Systems in *P. pantotrophus* (a) und *Alc. vinosum* (b). (Franz et al., 2009)

Die drei Sox-Proteine aus *Alc. vinosum* sind *in vivo* essentiell für die Oxidation von Thiosulfat (Hensen et al., 2006), da *soxB*-, *soxX*- und *soxBX*-Mutanten kein Thiosulfat mehr zu Sulfat oxidieren konnten. Diese Mutationen wurden durch die Insertion einer  $\Omega$ -Kanamycinkassette hervorgerufen. Die Deletion des *soxY*-Gens führte auch zum Verlust der Fähigkeit, Thiosulfat zu verwerten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl SoxYZ sowie SoxB *in vitro*, bei der Oxidation von Thiosulfat, Cytochrom *c* reduzieren können. Die Proteine interagieren dabei sowohl mit SoxXA sowie mit SoxCD aus *P. pantotrophus* (Welte et al., 2009).

### 1.3.3 Die Verwertung des Elementarschwefels und dessen Oxidation zu Sulfid

Die im Periplasma gespeicherten Schwefelkugeln beinhalten Polysulfanketten, die organische Reste an beiden Seiten gebunden haben ( $R-S_n-R$ ;  $n > 2$ ) und wahrscheinlich aus Glutathion oder Glutathionamid bestehen (Prange et al., 1999, 2002).

Hydrophobe Schwefelkugelproteine, SgpABCD (Alvin\_1905, Alvin\_0358, Alvin\_1325, Alvin\_2515) umschließen diese. SgpABC besitzen keine Cysteinreste und sind somit nicht in der Lage, Schwefel zu binden, womit sie eher eine strukturelle Funktion ausüben. Auch für SgpD, welches im Zuge der Schwefelkugel-Proteomanalysen identifiziert werden konnte, wird eine rein strukturelle Funktion vermutet, obwohl es einen Cysteinrest besitzt (Schmidt et al., 1971; Brune, 1995; Pattaragulwanit and Dahl, 1995; Weissgerber et al., 2014b).

*Alc. vinosum* ist in der Lage, den gespeicherten Schwefel als Elektronendonator für die anoxygene Photosynthese zu nutzen (Thiele, 1968). Hierfür müssen die Schwefelkugeln zunächst aktiviert und vom Periplasma, über die Membran, ins Cytoplasma transportiert werden, da die folgende Oxidation durch die cytoplasmatische, revers agierende Sulfit-Reduktase DsrAB (Alvin\_1251/Alvin\_1252) erfolgt (Pott and Dahl, 1998; Dahl et al., 2005). Dieser Vorgang ist bis heute noch nicht verstanden, wobei vermutet wird, dass der Schwefel als Persulfid, gebunden an ein organisches Carriermolekül, transportiert wird (Dahl et al., 2008).

Weiterhin spielen Schwefeltransferasen für den Transfer des Schwefels zu DsrAB eine wesentliche Rolle, wie für TusA bereits gezeigt werden konnte (Stockdreher et al., 2014). Hier überträgt die Schwefeltransferase Rhd\_2599 zunächst den Schwefel auf TusA, bei dem es sich um ein Schwefel/Thiosulfat-Carriermolekül handelt, das in *E. coli* zur tRNA-Modifikation beiträgt (Dahl

et al., 2013b). In *Alc. vinosum* transferiert es den Schwefel weiter auf DsrEFH, eine weitere, cytoplasmatische Schwefeltransferase. In dem darauf folgenden Schritt persulfuriert DsrEFH das cytoplasmatische DsrC, an welchem wiederum die Oxidation des Schwefels und die Abspaltung von Sulfit mittels DsrAB stattfindet (Stockdreher et al., 2014; Löffler et al., 2020).

Neben der Sulfitreduktase DsrAB (Alvin\_1251 / Alvin\_1252) sind weitere Dsr-Proteine (DsrEFHCMKLJOPNRS) für die Oxidation verantwortlich, deren Gene stromabwärts von *dsrB* liegen (Alvin\_1253 - Alvin\_1265) (Dahl et al., 2005; Lübbe et al., 2006; Sander et al., 2006; Grimm et al., 2010).

Die Sulfitreduktase DsrAB aus *Alc. vinosum* ist homolog zu den dissimilatorischen Sulfitreduktasen aus Sulfat-reduzierenden Bakterien, die Sulfit zu Sulfid reduzieren (Hipp et al., 1997). In Schwefel-oxidierenden Bakterien arbeitet sie allerdings in umgekehrter Richtung (Schedel et al., 1979), wodurch die Bildung von Sulfit erfolgen kann. Es wurde vermutet, dass bei der Oxidation von DsrC eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen ausgebildet wird (Stockdreher et al., 2014; Venceslau et al., 2014), welche folglich vom membranständigen DsrMKJOP-Komplexes reduziert werden könnte. Nach neuen Erkenntnissen scheint aber auch die Ausbildung eines DsrC-Trisulfides wahrscheinlich zu sein (Santos et al., 2015), wodurch ein alternativer Weg beschrieben werden kann. Hier könnte der DsrMKJOP-Komplex die Ausbildung des DsrC-Trisulfides aus dem zuvor persulfuriertem DsrC katalysieren. DsrAB würde folglich DsrC oxidieren, wodurch Sulfit entlassen würde und die Cysteine im DsrC für eine neue Reaktion frei wären. Die bei dieser Oxidation frei werdenden Elektronen, könnten dann auf das Eisen-Schwefel-Flavoprotein DsrL übertragen werden, das essentiell für die Schwefeloxidation in *Alc. vinosum* ist (Dahl et al., 2005; Lübbe et al., 2006). Es besitzt auffällige Sequenzähnlichkeiten zur einer Untereinheit des *Thermotoga maritima* NfnAB-Komplexes, die für die Elektronen-Bifurkation verantwortlich ist (Demmer et al., 2015). Bei diesem Vorgang kann eine endergonisch ablaufende Reaktion ermöglicht werden, womit eine  $\text{NAD}^+$ -Reduktion wahrscheinlich wäre. Kürzlich konnte eine starke Interaktion zwischen DsrL und DsrAB nachgewiesen und die katalytischen Fähigkeiten von DsrL näher untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass DsrL *in vitro* Elektronen von NADH auf DsrAB transferiert, damit dann DsrAB Sulfit reduzieren kann (Löffler et al., 2020). In Schwefeloxidierern wäre folglich denkbar, dass DsrL als  $\text{NAD}^+$ -Reduktase fungieren könnte, um Elektronen, die aus der Bildung von Sulfit stammen, auf  $\text{NAD}^+$  zu übertragen, womit NADH entstehen könnte (**Abb. 1.2**). Dieser Vorgang wäre nützlich, um den revers und energieaufwendigen Elektronentransport zu minimieren, der für die Bildung von Reduktionsäquivalenten zur  $\text{CO}_2$ -Fixierung benötigt wird.

#### 1.3.4 Die Oxidation von Sulfit

Im finalen Schritt wird die Umsetzung von Sulfit zu Sulfat primär durch das membrangebundene SoeABC katalysiert (Dahl et al., 2013a). Dieses Polysulfid-Reduktase-ähnliche Protein ist über SoeC an der Membran verankert, sodass das Eisen-Schwefelprotein SoeB und das Molybdoprotein SoeA zum Cytoplasma ausgerichtet sind. Dieser Komplex wurde sowohl in phototrophen sowie chemotrophen Schwefeloxidierern gefunden. Alternativ kann Sulfit auch indirekt über die APS-Reduktase (Alvin\_1119-Alvin\_1121) und der ATP-Sulfurylase (Alvin\_1118) oxidiert werden. Hierbei katalysiert zunächst die APS-Reduktase die Reaktion von Sulfit und AMP zu Adenosin-5'-Phosphat (APS), welches an der ATP-Sulfurylase unter ATP-Bildung zu Sulfat freigesetzt wird (Dahl et al.,

2008). Dies scheint aber keine wesentliche Reaktion für die Sulfitoxidation zu sein, da *aprAB*-Deletionsmutanten die selben Sulfitoxidationsraten wie der Wildtyp aufwiesen (Dahl, 1996).

### 1.3.5 Mögliche Aufgaben von periplasmatischen Schwefeltransferasen

Periplasmatische Schwefeltransferasen könnten spezifische Schwefeltransfer-Reaktionen während der Oxidation von Thiosulfat und Sulfid katalysieren und folglich an der Bildung von Schwefelkugeln beteiligt sein. Wie bereits erwähnt, besitzt *Alc. vinosum* keinen SoxCD-Komplex, womit der am SoxY-gebundene Sulfanschwefel nicht weiter oxidiert werden kann. Vermutlich wird dieser zu wachsenden Schwefelketten transferiert. Hierbei könnte die Schwefeltransferase SoxL eine wesentliche Rolle spielen, da sich das kodierende Gen in unmittelbarer Umgebung der anderen *sox* Gene befindet. Diese Schwefeltransferase wies in vorherigen Untersuchungen keine Thiosulfat:Cyanid Schwefeltransferase-, 3-Mercaptopyruvat:Cyanid-Schwefeltransferase oder Thiosulfatreduktase-Aktivität *in vitro* auf. Fügte man das isolierte Protein allerdings zum Sox-Aktivitäts-Assay hinzu, konnte eine Steigerung der Oxidationsrate von Thiosulfat *in vitro* erreicht werden, ohne die Elektronenausbeute zu erhöhen (Welte et al., 2009). Dies verdeutlicht, dass SoxL für eine schnellere Regenerierung von SoxYZ verantwortlich sein könnte, indem es den Sulfanschwefel von diesem übernimmt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es zu den meist vorkommenden Proteinen während des Wachstums auf Schwefel gehört (Weissgerber et al., 2014a), wie in **Abbildung 1.5** dargestellt ist. In diesem Zusammenhang ist nicht auszuschließen, dass weitere periplasmatische Schwefeltransferasen (Alvin\_0258, Alvin3028) als „back-up“-System fungieren könnten. Weiterhin wird vermutet, dass der Schwefel als Glutathion bzw. Glutathionamidpersulfid ins Cytoplasma transportiert wird. Der genaue Vorgang zur Bildung dieser Persulfide ist zwar unbekannt, allerdings könnten auch hier periplasmatische Schwefeltransferasen beteiligt sein.

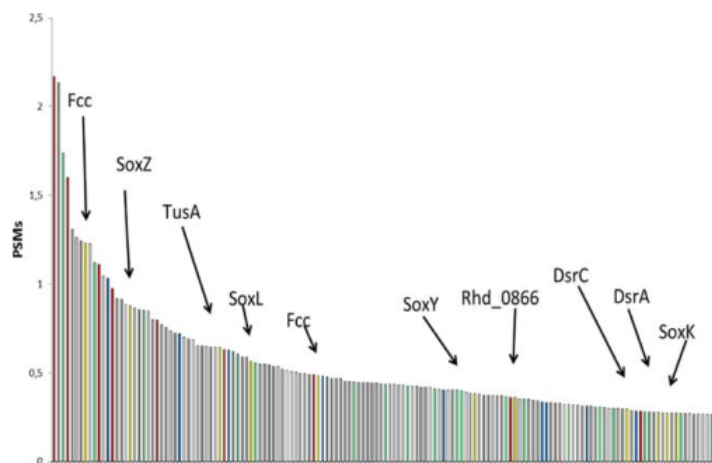


Abbildung 1.5: **Die 150 meist vorhandenen Proteine in *Alc. vinosum* während des Wachstums auf Schwefel als Elektronendonator.** Die Proteine wurden in fünf funktionelle Gruppen eingeteilt: Energiekonservierung (blau); Kohlenstoff-Metabolismus (grün); Gen-Expression, Replikation und Chaperone (grau); Photosynthese (rot); and Schwefel-Metabolismus (gelb) (Weissgerber et al., 2014a).



## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Funktion periplasmatischer Schwefeltransferasen im Zuge der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen näher beleuchtet werden. Im Fokus stand hierbei die periplasmatische Schwefeltransferase SoxL und inwiefern sie eine Rolle für das Sox-System während der Oxidation von Thiosulfat spielt. Hierfür sollten die strukturellen Eigenschaften sowie die Fähigkeit Schwefel zu binden untersucht werden, da in vorherigen Experimenten keine Rhodaneseaktivität nachgewiesen werden konnte (Welte et al., 2009). Weiterhin sollte das katalytische Cystein von SoxL identifiziert und eine Interaktion mit SoxYZ nachgewiesen werden. Hierfür war es ebenfalls notwendig die strukturellen Eigenschaften von SoxYZ zu analysieren, um eine mögliche Interaktion näher beleuchten zu können.

Da weitere periplasmatische Schwefeltransferasen (Alvin\_0258, Alvin\_3028) als „back-up“-System fungieren oder an anderen Schwefeltransfermechanismen im Periplasma beteiligt sein könnten, wurden diese näher charakterisiert. Hierfür wurden rekombinante Proteine aufgereinigt und auf ihre Rhodaneseaktivität mit unterschiedlichen Substraten untersucht. Für Alvin\_3028 galt es weiterhin die Position des katalytischen Zentrums zu bestimmen, da es membranständig ist und das aktive Cystein auch dem Cytoplasma zugeneigt sein könnte. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die genannten Schwefeltransferasen bei der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen eine Rolle spielen, wurden Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation der entsprechenden Gene durchgeführt und Deletionsmutanten erzeugt, welche phänotypisch untersucht wurden.



## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

1,5- IAEDANS	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
30 % Acrylamid / Bisacrylamid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
4-Chloro-1-Naphtol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
4x Rotiload 1	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Anhydrotetracyclin	IBA (Göttingen, Deutschland)
Anti-Digoxigenin-AP	Roche (Mannheim, Deutschland)
Blocking reagent	Roche (Mannheim, Deutschland)
Bradford reagent	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
CDP-Star	Roche (Mannheim, Deutschland)
D-Desthiobiotin	IBA (Göttingen, Deutschland)
dig-dUTP	Roche (Mannheim, Deutschland)
dNTPs	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
DTT	Roche (Mannheim, Deutschland)
GelRed	Biotium (Hayward, USA)
Monobromobimane	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Rifampicin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
SDS	Serva (Heidelberg, Deutschland)

Alle anderen Chemikalien wurden von folgenden Firmen erhalten: Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland).

#### 2.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIAP)	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Alkalische Phosphatase (FastAP)	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
DNase I, RNase-free	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Lysozym	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Restriktionsenzyme	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Ribonuclease A	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
T4 DNA Ligase	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)

### 2.1.3 Kits

BCA Protein Assay	Pierce (Rockford, USA)
GC-RICH PCR System	Roche (Mannheim, Deutschland)
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
GeneJET Gel Extraction Kit	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
First-DNA all-tissue Kit	Genial (Troisdorf, Deutschland)

### 2.1.4 Materialien

Ni-NTA Agarose	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Strep-Tactin Superflow	IBA (Göttingen, Deutschland)
Anaerocult A + Anaerotest	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Cellulose Nitratfilter	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Centriplus	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
ABgene PCR Plates	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Adhesive PCR Film	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Entwickler	Kodak (Rochester, USA)
Dialyseschlauch	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Fixierungslösung	Kodak (Rochester, USA)
Membranfilter	Whatman (Dassel, Deutschland)
PD Mini-Trap Säulen	GE Healthcare (München, Deutschland)
Polypropylen Säulen	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Roth Nylonmembran	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
RNase AWAY	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
sterile Spritzenfilter	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Vivaspin 500	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Whatman 3MM Papier	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
X-ray film X-OMAT AR	Kodak (Rochester, USA)

### 2.1.5 Software und Online-Programme

Tabelle 2.1: **Verwendete Software und Online-Programme.**

Software	Funktion	Referenz / Quelle
Bioedit	Sequenz Alignment Editor	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html">http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html</a>
BLAST	Protein- und DNA-Sequenz Vergleiche	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
Clone Manager 9	Sequenz-Prozessierung	Sci-Ed Software (Cary, USA)
ClustalW	Sequenz-Alignment	<a href="http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw">http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw</a>
Delta mass	Analyse von molekularen Massen	<a href="https://abrf.org/delta-mass">https://abrf.org/delta-mass</a>
Expasy	Datenbank für DNA- und Protein-Analyse	<a href="https://www.expasy.org/">https://www.expasy.org/</a>
Photoshop Elements	Bildbearbeitung	<a href="https://www.adobe.com">https://www.adobe.com</a>
iCycler iQ Software	Kontrollsoftware für iCycler	Bio-Rad (München, Deutschland)
INTAS GDS	Kontrollsoftware für INTAS Bildgebungssystem	INTAS (Göttingen, Deutschland)
LYX 2.1	Textbearbeitungsprogramm	<a href="https://www.lyx.org/WebDe.Home">https://www.lyx.org/WebDe.Home</a>
PC1000	HPLC Kontrollsoftware	Thermo Electron (Dreieich, Deutschland)
SignalP	Untersuchung von Signalpeptiden	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
TMHMM v. 2.0	Untersuchung von Transmembranhelices von Proteinen	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>
UV WinLab	Kontrollsoftware des Perkin Elmer Lambda 11	Perkin Elmer Inc. (Waltham, USA)
WinAspect	Kontrollsoftware des Jena Specord 210	Analytic Jena AG (Jena, Deutschland)

## 2.2 Organismen, Oligonukleotide und Plasmide

### 2.2.1 Organismen

Die *Escherichia coli* und *Allochromatium vinosum* Stämme, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in **Tabelle 2.2** und **Tabelle 2.3** zusammengefasst.

Tabelle 2.2: **Verwendete *Alc. vinosum* Bakterienstämme.**

Bakterienstamm	Genetische Marker	Referenz
<b><i>Allochromatium vinosum</i></b>		
Rif50	Rif <sup>r</sup> ; Rifampicin-resistente Mutante von <i>Alc. vinosum</i> DSM 180 <sup>T</sup>	Lübbe et al. (2006)
△ <i>soxL</i>	Rif50; Rif <sup>r</sup> ; <i>in frame</i> Deletion von <i>soxL</i>	diese Arbeit
△ <i>0258</i>	Rif50; Rif <sup>r</sup> ; <i>in frame</i> Deletion von <i>Alvin_0258</i>	diese Arbeit
△ <i>tsdA</i>	Rif50; Rif <sup>r</sup> ; <i>in frame</i> Deletion von <i>tsdA</i>	Renate Zigann
△ <i>tsdA</i> △ <i>0258</i>	Rif50; Rif <sup>r</sup> ; <i>in frame</i> Deletion von <i>tsdA</i> , <i>Alvin_0258</i>	diese Arbeit
△ <i>tsdA</i> △ <i>soxL</i>	Rif50; Rif <sup>r</sup> ; <i>in frame</i> Deletion von <i>tsdA</i> , <i>soxL</i>	diese Arbeit
△ <i>tsdA</i> △ <i>0258</i> △ <i>soxL</i>	Rif50; Rif <sup>r</sup> ; <i>in frame</i> Deletion von <i>tsdA</i> , <i>Alvin_0258</i> , <i>soxL</i>	diese Arbeit
△ <i>soxK</i>	Rif50; Rif <sup>r</sup> ; <i>in frame</i> Deletion von <i>soxK</i>	Katja Kirsch

Tabelle 2.3: **Verwendete *E. coli* Bakterienstämme.**

Bakterienstamm	Genetische Marker	Referenz
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> ; $\Phi$ 80d; lacZ $\Delta$ M15; $\Delta$ (lacZYA-argF)U169; regA; endA1; hsdR17 (rk <sup>-</sup> mk <sup>+</sup> ); supE44; $\lambda$ <sup>-</sup> thi-1; gyrA; relA1	Hanahan (1983)
S17-1	294 (recA pro res mod <sup>+</sup> ); Tp <sup>r</sup> ; Sm <sup>r</sup> (pRP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7)	Simon et al. (1983)
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> ; ompT; hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ); gal; dcm; met; (DE3)	Novagen (Madison, USA)
C41 (DE3) /	abgeleitet von BL21 (DE3),	Miroux and Walker (1996)
C41 (DE3)	mindestens eine nicht beschriebene Mutation	
K12	Wildtyp	DSM 498

## 2.2.2 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) erworben.

Tabelle 2.4: **Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung von *Alc. vinosum* Mutanten.** Restriktionsstellen sind unterstrichen dargestellt.

Oligo-nukleotide	Sequenz (5' → 3')	Referenz
<b>Herstellung und Screening von <i>Alc. vinosum</i> <math>\Delta</math>soxK</b>		
$\Delta$ SoxK-for1 HindIII	tagccta <u>agc</u> ttgggaaaatcgg	Katja Kirsch
$\Delta$ SoxK-rev1	ggatacggatacggatccaacacaccgtt	Katja Kirsch
$\Delta$ SoxK-for2	aacgggtgttggataccgtatccgtatcc	Katja Kirsch
$\Delta$ SoxK-rev2 HindIII	ggaggaa <u>agc</u> ttcatcatgacc	Katja Kirsch
<b>Herstellung und Screening von <i>Alc. vinosum</i> <math>\Delta</math>tsdA<math>\Delta</math>0258</b>		
$\Delta$ 0258-for1 HindIII	catccaa <u>agc</u> ttcaacaactatcgag	diese Arbeit
$\Delta$ 0258-rev1	gtggtttcaaggatgtttggttctctaat	diese Arbeit
$\Delta$ 0258-for2	attagagaaccaaacatcccttgaaaccac	diese Arbeit
$\Delta$ 0258-rev2 HindIII	gagagaa <u>agc</u> ttttttcgaggtgacga	diese Arbeit
<b>Herstellung und Screening von <i>Alc. vinosum</i> <math>\Delta</math>tsdA<math>\Delta</math>soxL</b>		
$\Delta$ SoxL-HindIII-f1	ggaacaca <u>agc</u> tttgccgatggccag	diese Arbeit
$\Delta$ SoxL-r1	gcgacactcagggtacatactcgagtct	diese Arbeit
$\Delta$ SoxL-f2	agactcgagtatgtagccctgagtgtcgc	diese Arbeit
$\Delta$ SoxL-HindIII-r2	gccatca <u>agc</u> ttcgggtcagctcctc	diese Arbeit
$\Delta$ SoxL-for3	cgccatcatgaaccactaccctcgc	diese Arbeit
$\Delta$ SoxL-rev3	gccagcagactaccgaggtgcttg	diese Arbeit
<b>Herstellung und Screening der <i>Alc. vinosum</i> 3028::<math>\Omega</math>-Sm Mutante</b>		
lpm3028for HindIII	cggcagga <u>agc</u> ttttatcattg	diese Arbeit
lpm3028rev HindIII	gttgccgga <u>agc</u> ttcccttga	diese Arbeit

Tabelle 2.5: **Verwendete Oligonukleotide für die RT- / qRT-PCR.**

Oligo-nukleotide	Sequenz (5'→3')	Referenz
RT-0258-for	tgctgatcgacatccgtacc	diese Arbeit
RT-0258-rev	actgcttctgcacatagccg	diese Arbeit
RT-2171-for	atcggcgagctggaagtac	diese Arbeit
RT-2171-rev	ttccaggggatgttcacc	diese Arbeit
RT-3028-for	tgacctacaatctcatcgtcgg	diese Arbeit
RT-3028-rev	gttcatcgggatgttcaggg	diese Arbeit
RT-SoxK-for	tggtctgaaacgccggac	diese Arbeit
RT-SoxK-rev	gcctcggcgagttctctg	diese Arbeit
RT-SoxK/L-for	gaacagaacgccgacttcc	diese Arbeit
RT-SoxK/L-rev	agtgcaagcgtgtgagac	diese Arbeit

Tabelle 2.6: **Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung von rekombinanten Proteinen.** Restriktionsstellen sind unterstrichen dargestellt.

Oligo-nukleotide	Sequenz (5'→3')	Referenz
<b>Überexpression von Alvin_0258, Alvin_3028 und SoxYZ</b>		
0258for-pelB $\Delta$ del	gaaccac <u>atatg</u> ccgatatcaatccgttc	Katja Kirsch
0258revHindIII	cggtc <u>aaagcttgc</u> agttggtacaggtttcc	Katja Kirsch
3028forNdeI	gctc <u>acatatgt</u> cacaactcatcgag	Katja Kirsch
3028revHindIII	cggtc <u>gaagcttgc</u> gcttcttgc	Katja Kirsch
SoxYZ(-SP)-for	acgc <u>cagaattcat</u> ggccgactggaacgcagc	diese Arbeit
SoxYZ-NcoI-rev	tcggc <u>gcatggc</u> agccgctgatctcgg	diese Arbeit
<b>Charakterisierung von Alvin_3028</b>		
phoA-NotI-for	gtacctgac <u>gcgccgctt</u> ataca	diese Arbeit
phoA-XhoI-rev	gatatgcatctc <u>gagcctct</u> agaagaag	diese Arbeit
uidA-HindIII-f	cgaggagt <u>ccaagcttt</u> acgtcctgtag	diese Arbeit
uidAEI <sub>r</sub>	aattctc <u>gagtcattgtt</u> gctccctgct	Kallnik et al. (2010)
uidA-NdeI-f	gaattcgaggag <u>catatgat</u> ttacgtcc	diese Arbeit
phoA-NdeI-NKf	cctgac <u>catatgtctt</u> atacacaagtagcgtcc	diese Arbeit
uidA-HindIII-NKf	cgaggaga <u>agcttatgtt</u> acgtcctgtag	diese Arbeit

Tabelle 2.7: **Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung von rekombinanten SoxL-Proteinen bzw. mutierten SoxL-Proteinen.** Restriktionsstellen sind unterstrichen dargestellt. Das Basentriplett, welches die Mutation besitzt, ist fett gekennzeichnet.

Oligo-nukleotide	Sequenz (5' → 3')	Referenz
SoxL-NdeI-for	ctcgcgc <u>catatg</u> gccgacaacaagatc	Welte et al. (2009)
SoxL-BamHI-rev	tcccggggatc <u>ctc</u> cagggctggacgct	Welte et al. (2009)
forwSoxLC68	gatcgcggct <u>ctc</u> ccgcccttc	Domin (2013)
revSoxL68	gaaggcgagagccgcgatc	Domin (2013)
forwSoxLC72	ccgccctt <u>ctc</u> gttcagcc	Domin (2013)
revSoxLC72	ggctgaac <u>gg</u> agaaggcg	Domin (2013)
forwSoxLC179	tgctctt <u>ctc</u> caacggcatct	Pankraz (2009)
revSoxLC179	atgccgtt <u>gg</u> agaagagcac	Pankraz (2009)
forwSoxLC184	ggcatctgg <u>tc</u> cccgagtc	Pankraz (2009)
revSoxLC184	cgactgcggg <u>g</u> accagatgcc	Pankraz (2009)

### 2.2.3 Plasmide

Die Sequenzen der Inserts, die in Plasmide kloniert wurden, konnten von GATC (Konstanz, Deutschland) verifiziert werden.

Tabelle 2.8: **Plasmide zur Herstellung von *Alc. vinosum* Mutanten.**

Plasmid	Genotyp	Referenz
pK18 <i>mobSacB</i>	Km <sup>r</sup> ; lacZ <sup>r</sup> ; <i>sacB</i> , Mob <sup>+</sup>	Schäfer et al. (1994)
pK18 <i>mobSac</i> Δ <i>tsdA</i>	Km <sup>r</sup> ; lacZ <sup>r</sup> ; <i>sacB</i> , Mob <sup>+</sup> ; Amplikon mit deletiertem <i>tsdA</i> , kloniert über die <i>Bam</i> HI-Restriktionsstellen	Denkmann et al. (2012)
pK18 <i>mobSac</i> Δ <i>0258</i>	Km <sup>r</sup> ; lacZ <sup>r</sup> ; <i>sacB</i> , Mob <sup>+</sup> ; Amplikon mit deletiertem <i>Alvin_0258</i> , kloniert über die <i>Bam</i> HI-Restriktionsstellen	diese Arbeit
pK18 <i>mobSac</i> Δ <i>soxL</i>	Km <sup>r</sup> ; lacZ <sup>r</sup> ; <i>sacB</i> , Mob <sup>+</sup> ; Amplikon mit deletiertem <i>soxL</i> , kloniert über die <i>Bam</i> HI-Restriktionsstellen	diese Arbeit
pK18 <i>mobSac</i> Δ <i>soxK</i>	Km <sup>r</sup> ; lacZ <sup>r</sup> ; <i>sacB</i> , Mob <sup>+</sup> ; Amplikon mit deletiertem <i>soxK</i> , kloniert über die <i>Bam</i> HI-Restriktionsstellen	Katja Kirsch
pSUP301	Ap <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup> ; RP4; <i>oriT</i> ; p15A; <i>ori</i> Mob <sup>+</sup>	Simon et al. (1983)
pHP45Ω-Sm	Ap <sup>r</sup> ; Sm <sup>r</sup>	Fellay et al. (1987)
pSUP301-3028	Ap <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup> ; RP4; <i>oriT</i> ; p15A; <i>ori</i> Mob <sup>+</sup> ; <i>Alvin_3028</i> mittels <i>Hind</i> III in pSUP301 kloniert	diese Arbeit
pSUP301-3028::ΩSm	Ap <sup>r</sup> ; Km <sup>r</sup> ; RP4; <i>oriT</i> ; p15A; <i>ori</i> Mob <sup>+</sup> ; Sm <sup>R</sup> aus pHP45Ω-Sm in pSUP301-3028 kloniert	diese Arbeit



Tabelle 2.9: Plasmide zur Überexpression rekombinanter Rhodanesen und der Charakterisierung von *Alvin\_3028*.

Plasmid	Genotyp	Referenz
pET-15b	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); pelb <sup>+</sup>	Novagen (Madison, USA)
pET-22b	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (C-terminal); pelb <sup>+</sup>	Novagen (Madison, USA)
pET22-Alvin0258	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (C-terminal); <i>Alvin_0258</i> über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> in pET-22b kloniert; pelb <sup>-</sup>	Katja Kirsch
pET22-Alvin3028	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (C-terminal); <i>Alvin_3028</i> über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> in pET-22b kloniert; pelb <sup>-</sup>	Katja Kirsch
pBBR1p264	Km <sup>r</sup> ; <i>uidA</i>	Kallnik et al. (2010)
pSWFII	Ap <sup>r</sup> ; Promoterlose <i>phoA</i> Kasette	Ehrmann et al. (1990)
pet22-3028-phoA	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; <i>Alvin_3028</i> ; <i>phoA</i> über konstruierte <i>NotI</i> und <i>XhoI</i> in pET-22b kloniert; pelb <sup>-</sup>	diese Arbeit
pet22-3028-uidA	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; <i>Alvin_3028</i> ; <i>uidA</i> über konstruierte <i>HindIII</i> und <i>XhoI</i> in pET-22b kloniert; pelb <sup>-</sup>	diese Arbeit
pet22b-phoA	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; <i>phoA</i> über konstruierte <i>NotI</i> und <i>XhoI</i> in pET-22b kloniert; pelb <sup>+</sup>	diese Arbeit
pet22-phoA	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; <i>phoA</i> über konstruierte <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> in pET-22b kloniert; pelb <sup>-</sup>	diese Arbeit
pet22b-uidA	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; <i>Alvin_3028</i> ; <i>uidA</i> über konstruierte <i>HindIII</i> und <i>XhoI</i> in pET-22b kloniert; pelb <sup>+</sup>	diese Arbeit
pet22-uidA	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; <i>Alvin_3028</i> ; <i>uidA</i> über konstruierte <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> in pET-22b kloniert; pelb <sup>-</sup>	diese Arbeit

Tabelle 2.10: Plasmide zur Überexpression rekombinanter Sox-Proteine zur Analyse des Sox-Systems.

Plasmid	Genotyp	Referenz
pET22-SoxLC	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (C-terminal); <i>soxL</i> über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> in pET-22b kloniert; pelb <sup>-</sup>	Welte et al. (2009)
pET15b-SoxLN	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); <i>soxL</i> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pET-15b kloniert; pelb <sup>-</sup>	diese Arbeit
pET-XAK-Strep	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; Strep-Tag (C-terminal); <i>soxXAK</i> über <i>XbaI</i> und <i>HindIII</i> in pET-22b kloniert; pelb <sup>-</sup>	Molitor (2013)
pBStrepC	Ap <sup>r</sup> ; <i>Alvin_2167</i> über <i>XhoI</i> und <i>PstI</i> in pRP-IBA1 kloniert	Welte et al. (2009)
pYZHis	Ap <sup>r</sup> ; <i>Alvin_2111</i> und <i>Alvin_2112</i> über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> in pET22b kloniert; pelb <sup>-</sup>	Krätzer (2007)
pET-SoxY <sub>152</sub> Z	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (C-terminal); <i>soxY<sub>152</sub>Z</i> über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i> in pET-22b kloniert; pelb <sup>-</sup>	Pankraz (2009)
pASK-IBA3plus	Ap <sup>r</sup> ; Tet Promoter; Strep-Tag (C-terminal)	IBA (Göttingen, Deutschland)
pASK3-SoxYZ (-SP)	Ap <sup>r</sup> ; Tet Promoter; Strep-Tag (C-terminal); SoxYZ (-SP) über <i>EcoRI</i> und <i>NcoI</i> in pASK-IBA3plus kloniert	diese Arbeit

Tabelle 2.11: Plasmide zur Überexpression mutierter SoxL-Proteine.

Plasmid	Genotyp	Referenz
pET15b-soxL Cys <sub>68</sub> Ser	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); pelb <sup>-</sup> ; soxL <sub>Cys68Ser</sub> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pET-15b kloniert	Domin (2013)
pET15b-soxL Cys <sub>72</sub> Ser	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); pelb <sup>-</sup> ; soxL <sub>Cys72Ser</sub> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pET-15b kloniert	Domin (2013)
pET15b-soxL Cys <sub>68/72</sub> Ser	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); pelb <sup>-</sup> ; soxL <sub>Cys68/72Ser</sub> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pET-15b kloniert	Domin (2013)
pET15b-soxL Cys <sub>68/179</sub> Ser	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); pelb <sup>-</sup> ; soxL <sub>Cys68/179Ser</sub> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pET-15b kloniert	Domin (2013)
pET15b-soxL Cys <sub>68/184</sub> Ser	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); pelb <sup>-</sup> ; soxL <sub>Cys68/184Ser</sub> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pET-15b kloniert	Domin (2013)
pET15b-soxL Cys <sub>72/179</sub> Ser	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); pelb <sup>-</sup> ; soxL <sub>Cys72/179Ser</sub> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pET-15b kloniert	Domin (2013)
pET15b-soxL Cys <sub>72/184</sub> Ser	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); pelb <sup>-</sup> ; soxL <sub>Cys72/184Ser</sub> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pET-15b kloniert	Domin (2013)
pET15b-soxL Cys <sub>179</sub> Ser	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); pelb <sup>-</sup> ; soxL <sub>Cys179Ser</sub> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pET-15b kloniert	Pankraz (2009)
pET15b-soxL Cys <sub>184</sub> Ser	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); pelb <sup>-</sup> ; soxL <sub>Cys184Ser</sub> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pET-15b kloniert	Pankraz (2009)
pET15b-soxL Cys <sub>179/184</sub> Ser	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); pelb <sup>-</sup> ; soxL <sub>Cys179/184Ser</sub> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pET-15b kloniert	Domin (2013)
pET15b-soxL Cys <sub>68/179/184</sub> Ser	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); pelb <sup>-</sup> ; soxL <sub>Cys68/179/184Ser</sub> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pET-15b kloniert	Domin (2013)
pET15b-soxL Cys <sub>72/179/184</sub> Ser	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); pelb <sup>-</sup> ; soxL <sub>Cys72/179/184Ser</sub> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pET-15b kloniert	Domin (2013)
pET15b-soxL Cys <sub>68/72/179</sub> Ser	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); pelb <sup>-</sup> ; soxL <sub>Cys68/72/179Ser</sub> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pET-15b kloniert	diese Arbeit
pET15b-soxL Cys <sub>68/72/184</sub> Ser	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); pelb <sup>-</sup> ; soxL <sub>Cys68/72/184Ser</sub> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pET-15b kloniert	diese Arbeit
pET15b-soxL Cys <sub>68/72/179/184</sub> Ser	Ap <sup>r</sup> ; T7 Promoter; His-Tag (N-terminal); pelb <sup>-</sup> ; soxL <sub>Cys68/72/179/184Ser</sub> über <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i> in pET-15b kloniert	Domin (2013)

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Kultivierung und Lagerung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *Escherichia coli* im flüssigen oder festen Medium erfolgte bei 37 °C in Anwesenheit von Sauerstoff. Für die Kultivierung im Flüssigmedium wurde ein Schüttelinkubator (180 rpm) verwendet (HT 1 FORS AI 70, INFORS, Bottmingen, Deutschland). Für Selektionsvorgänge wurden Antibiotika mit folgenden Konzentrationen dem Medium beigemischt: 100 µg/mL Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin, 50 µg/ml Streptomycin.

*E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen wurden für molekulares Klonen und für die Vervielfältigung von Plasmiden verwendet. *E. coli* S17-1 diente für Konjugationsvorgänge mit *Alc. vinosum* und *E. coli* BL21(DE3) wurde für die Produktion von löslichen Proteinen verwendet. Die *E. coli* Stämme C41 und C43 wurden für die Produktion und Aufreinigung von Membranproteinen verwendet.

*E. coli* wurde hauptsächlich in LB-Medium kultiviert (Sambrook et al., 1989). Für die Verwendung von Agarplatten wurde 1,5 % (w/v) Agar hinzugefügt.

#### **LB-(Luria Bertani) Medium**

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 L

Zur Herstellung von kompetenten Zellen wurde *E. coli* in 2x YT-Medium kultiviert (Sambrook et al., 1989).

#### **2x YT Medium**

Trypton	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 L

Um *E. coli* Stämme langfristig bei - 70 °C zu lagern wurden Übernachtskulturen 1:1 mit sterilem DMSO oder Glycerin versetzt.

### **2.3.2 Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen**

Um Plasmide in *E. coli* Zellen zu transformieren wurden diese nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode vorbereitet (Dagert and Ehrlich, 1974).

Hierfür wurde 5 mL des 2x YT-Mediums mit einer *E. coli* Kolonie angeimpft und bei 37 °C (180 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden 70 mL 2 x YT-Medium 1:100 mit der Vorkultur angeimpft und unter den gleichen Bedingungen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,5 inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen geerntet (4.000 x g; 10 min; 4 °C), das Zellpellet in 10,5 mL kalter CaCl<sub>2</sub>/MgSO<sub>4</sub>-Lösung resuspendiert und für 45 Minuten auf Eis gelagert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 3,5 mL kalter CaCl<sub>2</sub>/MgSO<sub>4</sub>-Lösung resuspendiert und 875  $\mu$ L steriles Glycerin hinzugegeben. Aliquots wurden darauffolgend bei - 70 °C gelagert.

#### **CaCl<sub>2</sub>/MgSO<sub>4</sub>-Lösung**

CaCl <sub>2</sub>	70 mM
MgSO <sub>4</sub>	20 mM

### 2.3.3 Heterologe Überproduktion von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Für die Überproduktion von löslichen, als auch Membranproteinen, wurden die entsprechenden Plasmide in *E. coli* BL21(DE3) bzw. *E. coli* C41 und *E. coli* C43 transformiert. Als Expressionsvektoren dienten hier Derivate von pET-15b, pET-22b (Novagen, Madison, USA) und pASK-IBA3plus (IBA, Göttingen, Deutschland).

500 mL LB Medium wurde 5%ig mit der entsprechenden Vorkultur angeimpft und bei 37 °C unter ständigem Schütteln bei 180 rpm solange inkubiert, bis die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 erreichte. Daraufhin wurden die pET-Systeme mit 0,1 mM IPTG und das pASK-IBA-System mit 50 µg/mL Anhydrotetracyclin induziert. Die Kulturen wurden nun zwei weitere Stunden unter gleichen Bedingungen inkubiert, bevor die Zellen anschließend geerntet (25.000 x g; 20 min; 4 °C) und die Pellets bei -20 °C gelagert wurden.

### 2.3.4 Kultivierung von *Allochromatium vinosum*

*Allochromatium vinosum* wurde photoorganoheterotroph in RCV-Medium (Weaver et al., 1975) oder photolithoautotroph in 0-Medium (Hensen et al., 2006) bei 30 °C unter anaeroben Bedingungen und in einem Lichtschrank (Biotron, Hilden, Deutschland) kultiviert. Folgende Antibiotikakonzentrationen wurden für die Selektion und Kultivierung von *Alc. vinosum* Mutanten zugesetzt: 50 µg/mL Rifampicin, 10 µg/mL Kanamycin, 10 µg/mL Ampicillin, 20 µg/mL Streptomycin.

#### Photoorganoheterotrophes Wachstum

RCV-Medium		Räh-Medium	
50 mL	Räh-Medium	60 g	Malat
0,5 g	Hefeextrakt	24 g	NH <sub>4</sub> Cl
1,8 g	NaOH	4 g	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
ad 950 mL	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1,4 g	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
		20 mL	10 x SL12 Lösung
		ad 1 L	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

#### KPP-Puffer

180 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>Puffer, pH 7

#### 10 x SL12 Lösung (Pfennig and Trüper, 1992)

30 g	EDTA
11 g	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
3 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
1,9 g	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
0,5 g	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O
0,42 g	ZnCl <sub>2</sub>
0,24 g	NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
0,18 g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>
0,02 g	CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
ad 1 L	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

Der KPP-Puffer wurde separat autoklaviert und zum RCV-Medium gegeben. Frische Medien wurden 10%ig mit *Alc. vinosum* angeimpft und in randvollen Glasflaschen inkubiert, um einen Sauerstoffausschluss zu gewähren. *Alc. vinosum* Stämme wurden regelmäßig auf Kontaminationen untersucht, indem kleine Proben auf LB-Agarplatten gegeben und bei 37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert wurden.

Für Konjugationsvorgänge wurden RVC-Platten hergestellt, indem 1,5 % (w/v) Agar zum Medium hinzugegeben wurde. Nach einer Konjugation wurden die Zellen auf RCR-Phytigel-Platten übertragen: 1 % (w/v) Phytigel, 0,5 % (w/v) NaCl, 0,02 % (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, 2 mM Natriumacetat und 2,6 mL Futterlösung (3,1 g HNaS x H<sub>2</sub>O, 5 g NaHCO<sub>3</sub>, ad 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>). Die Platten wurden in Anaerobenbehältern unter anaeroben Bedingungen kultiviert, indem das Anaerocult A Reagenz verwendet wurde.

### Photolithoautotrophes Wachstum

<u>0-Medium</u>		<u>Salz-Lösung</u>	
8 L	Salz-Lösung	3,3 g	KCl
1 L	Carbonat-Lösung	3,3 g	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
1 L	Phosphat-Lösung	4,3 g	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
		3,3 g	NH <sub>4</sub> Cl
		10 mL	10 x SL12
		ad 8 L	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

<u>Phosphat-Lösung</u>		<u>Carbonat-Lösung</u>	
3,3 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g	NaHCO <sub>3</sub>
ad 1 L	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1 L	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

Die Salz-, Carbonat- und Phosphat-Lösungen wurden separat autoklaviert und abgekühlt. Unter Begasung mit Stickstoff und ständigem Rühren wurde die Carbonat-, als auch Phosphat-Lösung zu der Salzlösung gegeben, wodurch ein trübes Medium entstand. Durch das Einleiten von Kohlenstoffdioxid wurde anschließend das Medium auf einen pH von 6,5-7 eingestellt. Das fertige Medium wurde randvoll in Glasflaschen abgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert. Wenn benötigt, wurde Sulfid, Thiosulfat oder Schwefel zugesetzt, deren Lösungen zuvor steril filtriert wurden.

Für eine dauerhafte Lagerung wurden *Alc. vinosum* Stämme in Flüssigstickstoffbehältern aufbewahrt. Hierfür wurden photoorganoheterotroph angezogene Kulturen geerntet (4000 rpm, 10 min.) und in 5 mL frischem RCV Medium resuspendiert. 900 µL wurden dann mit 10 % (v/v) DMSO versetzt, welches zuvor sterilisiert wurde und insgesamt 2 mL-Aliquots wurden in „Cryo Behälter“ (CryoTubes, Nunc) aufbewahrt.

### 2.3.5 Kultivierung von *Alc. vinosum* in Anwesenheit von reduzierten Schwefelverbindungen

#### „Batch“-Kultivierung

Um die Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen durch *Alc. vinosum* und diversen *Alc. vinosum* Mutanten zu untersuchen, wurden die einzelnen Stämme in luftdicht verschlossenen 250 mL-Glasflaschen kultiviert. Diese wurden mit 0-Medium und den entsprechenden reduzierten Schwefelverbindungen befüllt, welche zuvor steril filtriert wurden. Eine photoorganoheterotroph angezogene Vorkultur (250 mL; 4 Tage) wurde geerntet (14.000 x g; 10 min), in 0-Medium gewaschen, ebenfalls in diesem resuspendiert. 50-80 mL diente als Inokulat. Mittels Magnetrührer wurden die Kulturen langsam durchmischt und so um 60 W Lampen arrangiert, dass eine gleichmäßige Lichteinwirkung und eine konstante Temperatur von 30 °C gewährleistet werden konnte. Nach der Entnahme von Proben wurden die Flaschen erneut randvoll mit 0-Medium befüllt und fest verschlossen, um einen Einfluss von Sauerstoff zu vermeiden (**Abb. 2.1**).



Abbildung 2.1: Versuchsaufbau einer „Batch“-Kultivierung.

#### Kultivierung im Fermenter

Die Kultivierung im Fermenter stellte eine weitere Möglichkeit dar, die Umsetzung von reduzierten Schwefelverbindungen durch *Alc. vinosum* zu untersuchen. Hierfür wurden die Zellen photoorganoheterotroph in 1000 mL RCV-Medium für 3-4 Tage angezogen, anschließend geerntet (14.000 x g; 10 min), das Zellpellet in 0-Medium gewaschen und resuspendiert. Die Suspension diente anschließend als Inokulat, womit 1 L 0-Medium angeimpft wurde, welches zuvor in einen temperierbaren Fermenter gegeben wurde. Um die anaeroben Bedingungen aufrecht zu erhalten, wurde ein stickstoffhaltiger Ballon an diesen angebracht. Die Experimente wurden mittels Zusatz von steril filtrierten Schwefelverbindungen injiziert. Der pH wurde über eine pH-Elektrode (SteamLine SL 80-325pH, Schott, Mainz, Deutschland) kontrolliert und konstant bei einem pH von 7 gehalten, indem sterilisierte 1 M HCl- oder 1 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung hinzugegeben wurde. Die Inkubationstemperatur von 30 °C wurde über ein Wasserbad (Lauda M3/MT, MWG, Laude-Königshofen, Deutschland) garantiert und zwei Lampen (Osram, 60 W) versorgten die Kulturen mit Licht. Durch ständiges Rühren wurde eine gleichmäßige Durchmischung der Kultur erreicht. Zu bestimmten Zeiten wurde die OD<sub>690</sub> gemessen und Proben entnommen, um die Konzentrationen der Schwefelverbindungen im Medium als auch die Proteinkonzentrationen der Zellen zu bestimmen.

## 2.4 Analytische Bestimmung der Konzentrationen von Schwefelverbindungen

### 2.4.1 Bestimmung des intrazellulären Schwefels

Intrazellulärer Schwefel konnte kolorimetrisch bestimmt werden (Bartlett and Skoog, 1954). Hierfür wurden 200  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Zellkultur zentrifugiert (13.000 x g; 5 min) und die Zellpellets bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Zur Analyse des Schwefelgehalts wurde das Zellpellet in 200  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_{dest}$  resuspendiert und wie folgt fortgefahren:

100 $\mu\text{L}$	0,2 M Natriumcyanid Inkubation für 10 Minuten bei 100 °C
650 $\mu\text{L}$	$\text{H}_2\text{O}_{dest}$
50 $\mu\text{L}$	Zugabe des Eisen-Nitrat-Reagenz (30 g $(\text{FeNO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ in 40 mL 55 % $\text{HNO}_3$ ; ad 100 mL $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ )

Die Probe wurde anschließend zentrifugiert (13.000 x g; 5 min.) und die Absorption des Überstandes bei 460 nm gemessen. Die Kalibrierungskurve konnte durch die Verwendung von Natriumthiocyanat (0-350 nmol/ Probe) generiert werden.

### 2.4.2 Bestimmung von Sulfat

Die Sulfat-Bestimmung erfolgte wie beschrieben nach Sörbo (1987). Hierfür wurden 200  $\mu\text{L}$  Zellkultur abzentrifugiert (13.000 x g; 5 min.) und der Überstand mit 200  $\mu\text{L}$  0,5 M TCA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten (geöffnetes Cap) wurden die Proben erneut für eine Minute zentrifugiert und 200  $\mu\text{L}$  des Überstandes wurde mit 200  $\mu\text{L}$  0,25 M TCA und 100  $\mu\text{L}$   $\text{BaCl}_2$ -Reagenz versetzt. Die Proben wurden anschließend für 20 Minuten geschüttelt und es folgte die Bestimmung der Absorption bei 450 nm. Eine Kalibrierungskurve konnte mit 25-500 nmol  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  erhalten werden.

#### **BaCl<sub>2</sub>-Reagenz**

0,489 g	$\text{BaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
7,5 g	PEG 6000
ad 50 mL	$\text{H}_2\text{O}_{dest}$

### 2.4.3 Bestimmung von Sulfit

Die Bildung von Sulfit während der „Batch“- und Fermenter-Versuche wurde nach einer modifizierten Fuchsin-Methode bestimmt (Grant, 1947). Für die Analyse wurde 1 mL Kultur zentrifugiert (13.000 x g; 5 min) und 5-10 µL des Überstandes wurden wie folgt weiter verarbeitet:

690 µL	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> + Überstand
200 µL	2 % Zn-Acetat
100 µL	Fuchsin-Reagenz (0,04 % Fuchsin in 10 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) mischen und für 10 Minuten inkubieren
10 µL	37 % Formaldehyd mischen und für 10 Minuten inkubieren

Anschließend wurde die Absorption bei 570 nm bestimmt. Die Kalibrierungskurve wurde mit 0-40 nmol Natriumsulfit erhalten.

### 2.4.4 Bestimmung von Thiosulfat

Für die Bestimmung von Thiosulfat wurde das Protokoll nach Urban (1961) verwendet und die hierfür entnommenen Proben wurden direkt, ohne Einfrieren, untersucht. Eine Probe mit einem maximalen Thiosulfatgehalt von 250 nmol wurde der Kultur entnommen und mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf 650 µL aufgefüllt. 200 µL NaOAc, 50 µL CuCl<sub>2</sub> und 50 µL NaCN wurden anschließend hinzugefügt und nach kräftigem Mischen erfolgte der Zusatz von 50 µL des Eisen-Nitrat-Reagenz. Die Absorption wurde bei 460 nm bestimmt und die Kalibrierungskurve konnte mit Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (0-250 nmol) bestimmt werden.

#### Eisen-Nitrat-Reagenz

30 g	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> x 9 H <sub>2</sub> O
40 mL	HNO <sub>3</sub> (55 %)
ad 100 mL	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
0,2 M	NaCN
40 mM	CuCl <sub>2</sub>
0,2 M (pH 4,8)	NaOAc

### 2.4.5 Bestimmung von Tetrathionat

Für die Bestimmung von Tetrathionat wurde ein leicht modifiziertes Protokoll von Kelly et al. (1969) verwendet. Eine Probe mit einem maximalen Tetrathionatgehalt von 150 nmol wurde aus den Zellkulturen entnommen und direkt, ohne Einfrieren, zur Analyse weiter verarbeitet. Diese wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf 500 µL aufgefüllt. 50 µL Tris-Acetat (1 M; pH 8,7) und 50 µL NaCN (0,2 M) wurden hinzugefügt und nach kräftigem Mischen wurde die Mixtur für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 µL des Eisen-Nitrat-Reagenz beigefügt und die Absorption bei 460 nm gemessen. Die Kalibrierungskurve konnte mit K<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (0-150 nmol) erhalten werden.



### 2.4.6 Bestimmung von Sulfid

Die Bestimmung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Pachmayr (1960) und wurde wie folgt durchgeführt:

0,395 mL	Probe (mit 0-50 nmol Sulfidgehalt)
+ 250 µL	2 % Zn-Acetat
+ 100 µL	0,2 % Dimethyl-p-phenyl diaminchlorid in 20 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Probenansatz wird gemischt	
+ 0,005 mL	10 % NH <sub>4</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 12 H <sub>2</sub> O in 2 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Probenansatz wird gemischt und für 20 Minuten inkubiert	

Die anschließende Absorption erfolgt bei 670 nm und eine Kalibrierungskurve konnte mit HNaS x H<sub>2</sub>O (0-50 nmol) erhalten werden.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Isolierung von DNA und RNA

#### 2.5.1.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *Alc. vinosum*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *Alc. vinosum* erfolgte mittels modifizierter Sarkosyl-Lyse nach Bazaral and Helsinki (1968).

#### TE Puffer

10 mM TrisHCl, pH 8  
1 mM EDTA

#### TES Puffer

50 mM TrisHCl, pH 8  
0,5 mM EDTA  
50 mM NaCl

#### Saccharose-TES Puffer

20 % Saccharose (w/v) in TES Puffer

#### Lysozym-RNase Lösung

20 mg/mL Lysozym  
1 mg/mL RNase

#### Sarkosin Lösung

10 % (w/v) Laurylsarkosin  
250 mM EDTA

100 mg Zellpellet einer *Alc. vinosum* Kultur wurde in 2 mL eiskaltem TES-Puffer resuspendiert und anschließend zentrifugiert (14.000 x g; 10 min; 4 °C). Das Sediment wurde dann in 250 µL Saccharose-TES Puffer resuspendiert und eine Inkubation von 30 Minuten auf Eis folgte. Um die Zellen zu lysieren, wurde 250 µL Lysozym-RNase Lösung hinzugefügt und die Mischung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µL Sarkosin-Lösung wurde diese invertiert und die DNA konnte als viskose Masse ausgemacht werden. Durch das anschließende Auf- und Abpipettieren mittels steriler Kanüle wurde die DNA geschert, woraufhin 300 µL H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> hinzugegeben wurden.

Für die DNA-Extraktion wurde das gleiche Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) hinzugefügt und für 15 Minuten zentrifugiert (14.000 x g; 4 °C), wodurch drei Phasen entstanden. Die obere, wässrige Phase enthielt die DNA, in der mittleren Phase waren Proteine enthalten, wohingegen die untere Phase lipophile Bestandteile und Lösungsmittel enthielt. Die obere Phase wurde in ein neues Reagenzgefäß transferiert und die Prozedur einige Male wiederholt, um Kontaminationen von Polysacchariden und Proteinen zu minimieren. Anschließend wurde die DNA mit dem gleichen Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Zur Reinigung der DNA wurde diese in Dialyseschläuche überführt (MWCO 6000-8000) und in 1 L TE-Puffer dialysiert (3 bzw. 15 Stunden). Ein dritter Dialyseschritt erfolgte in 1 L H<sub>2</sub>O<sub>ultra-pure</sub> für zwei Stunden, bevor die DNA-Lösung in ein steriles Gefäß überführt und bei 4 °C gelagert werden konnte.

#### 2.5.1.2 Isolierung chromosomaler DNA von *E. coli*

Genomische DNA von *E. coli* wurde mittels „First-DNA all-tissue Kit“ (Genial, Troisdorf, Deutschland) nach den Angaben der Hersteller isoliert und bei 4 °C aufbewahrt.

#### 2.5.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA und Reinigung von DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels „GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit“ (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) nach Angaben der Hersteller.

Für Klonierungsvorgänge wurden DNA-Fragmente zunächst auf einem Agarosegel voneinander getrennt, die gewünschten Fragmente ausgeschnitten und diese mittels „GeneJet Gel Extraction Kit“ (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) gereinigt, indem die Angaben der Hersteller befolgt wurden. Dieses Kit wurde ebenfalls für die Aufreinigung von DNA verwendet, welche zuvor mit Restriktionsendonukleasen behandelt wurde.

#### 2.5.1.4 Isolierung von RNA aus *Alc. vinosum*

Die RNA aus *Alc. vinosum* Rif50 wurde aus Zellen isoliert, welche entweder photoorganoheterotroph (22 mM Malat) oder photolithoautotroph (50 mM elementarer Schwefel, 4 mM Sulfid, 4 mM Thio-sulfat) in temperierten Fermentern angezogen wurden, um für kontrollierte Bedingungen zu sorgen (Ausubel et al., 1997). Im Laufe der Oxidationsvorgänge wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen (2 x 35 mL; 14.000 x g; 10 min; 4 °C), um mögliche Änderungen der RNA-Level untersuchen zu können. Hierbei diente die photoorganoheterotrophe Kultur als Kontrolle. Die jeweiligen Pellets wurden in 350 µL RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) resuspendiert, welches 10 mM DTT enthielt. Anschließend wurden die Zellen durch ein Vortexverfahren (Ivoclar Vivadent Silamat S6, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) aufgeschlossen, bei welchem 0,1 mm Zirconia/Silica Kugeln verwendet werden. Nach der Sedimentierung der Kugeln und der Zelltrümmer (15.000 x g; 2 min; 4 °C) wurde der Überstand mit 500 µL Phenol sorgfältig für eine Minute gemischt. Daraufhin wurde 500 µL Chloroform hinzugefügt und erneut für eine Minute gemischt, bevor ein weiterer Zentrifugationsschritt (10.000 x g; 10 min; 4 °C) erfolgte. Die RNA im Überstand wurde nun präzipitiert, indem  $\frac{1}{10}$  Volumen Natriumacetat (3M; pH 6) und ein 2-faches Volumen an eiskaltem Ethanol hinzugefügt wurde. Die RNA aus insgesamt 70 mL Kultur wurde anschließend in 50-100 µL RNase freiem Wasser (Qiagen, Hilden, Deutschland) resuspendiert. Daraufhin erfolgte

der Einsatz von DNaseI (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland), um restliche DNA zu entfernen und die RNA konnte anschließend mittels „RNeasy Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland), nach den Angaben der Hersteller, aufgereinigt und bei - 70 °C gelagert werden.

### 2.5.1.5 Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren wurde mittels UV/Vis Spektrographie (Specord 210, Analytik Jena, Jena, Deutschland) bestimmt. Hierfür wurde die Absorption der verdünnten Proben bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die maximale Absorption von Nukleinsäuren befindet sich bei 260 nm, wobei ein Absorptionswert von 1 eine Konzentration von 50 µg/mL Doppelstrang bzw. 40 µg/mL RNA angibt (Sambrook et al., 1989). Proteine wiederum besitzen ihre maximale Absorption bei 280 nm. Um die Reinheit der Proben zu bestimmen wurde daher das Verhältnis von  $A_{260}/A_{280}$  berechnet, wobei Werte von 1,8-2 einen hohen Reinheitsgrad angeben.

### 2.5.2 Amplifizierungen mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten, mit definierter Länge, wurde mittels Polymerase-Ketten („Polymerase-Chain“-)Reaktion (PCR) nach Mullis et al. (1986) durchgeführt. Die Schmelztemperatur der Oligonukleotide ( $T_M$ ) wurde mit folgender Formel berechnet:  $T_M [°C] = 2(n_A + n_T) + 4(n_C + n_G)$ , wobei n die Anzahl der Basen angibt. Die Anlagerungs-Temperatur der Primer ( $T_a$ ) wurde 2-5 °C unter der niedrigsten Schmelztemperatur gesetzt.

#### 2.5.2.1 Standard PCR

Die PCR-Reaktionen betragen ein Gesamtvolumen von 50 µL und wurden im iCycler (Biorad, München, Deutschland) durchgeführt. Die DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) besitzt eine „proof-reading“-Funktion, da sie ebenfalls über eine 3´-5´ Exonukleaseaktivität verfügt und wurde daher hauptsächlich für Klonierungsvorgänge eingesetzt.

Standard PCR		Standard PCR Programm		
template DNA	ca. 1 µg	Initial-Denaturierung	95 °C	3 min
forward primer	10 pmol	Denaturierung	95 °C	30 sek
reverse primer	10 pmol	Anlagerung	$T_a$	30 sek
dNTP mix (je 10 mM)	1 µl	Elongation	72 °C	*
10 x <i>Pfu</i> Puffer	5 µl	33 Durchläufe		
(enthält 20 mM MgSO <sub>4</sub> )		Elongation	72 °C	10 min
<i>Pfu</i> polymerase	1 U			
rH <sub>2</sub> O	ad 50 µl			

\* Die Elongationszeit war abhängig von der Amplikonlänge und der Geschwindigkeit der DNA-Polymerase (*Pfu* Polymerase: 2 min/kb)

### 2.5.2.2 Kolonie PCR

Für eine Kolonie-PCR wurde Zellmaterial aus *Alc. vinosum* eingesetzt. Hierfür wurde 200 µL Flüssigkultur geerntet (9300 x g; 5 min), in 200 µL sterilem H<sub>2</sub>O<sub>ultra-pure</sub> gewaschen und in 50 µL H<sub>2</sub>O<sub>ultra-pure</sub> resuspendiert. Ganze Zellen wurden anschließend in die PCR-Reaktion eingesetzt und aufgeschlossen, indem die Initialdenaturierung auf 10 Minuten verlängert wurde. Erst nach diesem Schritt wurde die *Taq* Polymerase aus *Thermococcus aquaticus* (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) in den Reaktionsansatz hinzugefügt.

#### Standard PCR

Zellmaterial	1 µL
forward primer	10 pmol
reverse primer	10 pmol
dNTP Mix (je 10 mM)	1 µl
5 x <i>Taq</i> Puffer (+ KCl - MgCl <sub>2</sub> )	5 µl
<i>Taq</i> polymerase	1 U
DMSO	
rH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

#### Standard PCR program

Initial-Denaturierung	95 °C	3 min
Denaturierung	95°C	30 sek
Anlagerung	T <sub>a</sub>	30 sek
Elongation	72 °C	*
33 Durchläufe		
Elongation	72 °C	10 min

\* Die Elongationszeit war abhängig von der Amplikonlänge und der Geschwindigkeit der DNA-Polymerase (*Taq* Polymerase: 1 min/kb)

### 2.5.2.3 Digoxigenin-Markierung von DNA mittels PCR

Für DNA-DNA Hybridisierungs-Experimente (Southern-Hybridisierung) wurden DNA-Proben mit Digoxigenin markiert. Die hierfür verwendete PCR entsprach der Standard-PCR aus 2.5.2.1, wobei zusätzlich 20 µM Digoxigenin-dUTP zum Reaktionsansatz hinzugefügt, wohingegen die dTTP-Konzentration reduziert wurde (160 µM). Somit wurden Digoxigenin-dUTPs in die Amplikons eingebaut, welche nach Isolierung aus dem Agarosegel direkt für die Southern-Hybridisierung eingesetzt werden konnten.

### 2.5.2.4 Zielgerichtete Mutagenese durch „gene SOEING“

Das Einfügen von zielgerichteten Punktmutationen sowie *in frame* Deletionen wurde durch eine PCR-Methode erreicht, welche „gene splicing by overlap extension“ (gene SOEING) genannt wird

und von Horton (1995) beschrieben wurde. Um dies zu erreichen, waren drei unterschiedliche PCR-Reaktionen nötig (**Abb. 2.2**). Die ersten zwei Fragmente wurden separat amplifiziert, indem die Primer-Paare a/b bzw. c/d verwendet wurden. Diese Primer-Paare enthielten zusätzliche Sequenzen an den 5'-Enden („overlap-Regionen“), womit die resultierenden Amplikons selbst als Primer für die nächste Überlappungsreaktion dienen konnten. Diese dritte PCR wurde mit dem Primer-Paar a/d durchgeführt.

### Standard PCR

template DNA	ca.. 1 µg
forward primer	10 pmol
reverse primer	10 pmol
dNTP Mix (je 10 mM)	1 µl
10 x <i>Pfu</i> Puffer (enthält 20 mM MgSO <sub>4</sub> )	5 µl
<i>Pfu</i> polymerase	1 U
rH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

### Standard PCR program

Initialdenaturierung	95 °C	3 min
Denaturierung	95°C	30 sek
Anlagerung	T <sub>a</sub>	30 sek
Elongation	72 °C	*
33 Durchläufe		
Elongation	72 °C	10 min

\* Die Elongationszeit war abhängig von der Amplikonlänge und der Geschwindigkeit der DNA-Polymerase (*Pfu* Polymerase: 2 min/kb)

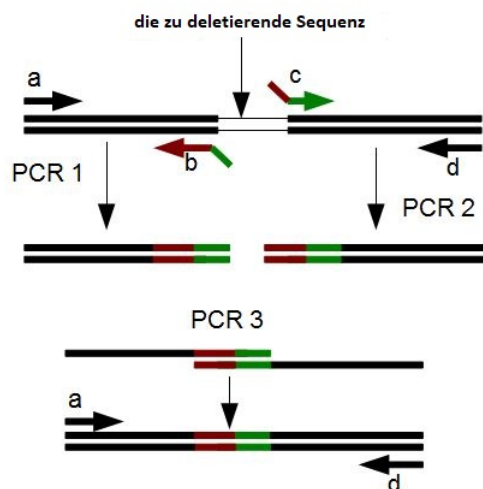


Abbildung 2.2: „Gene splicing by overlap extension (gene SOeng) PCR“.

### 2.5.2.5 cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA aus RNA wurde das „First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) nach den Angaben der Hersteller verwendet.

### 2.5.2.6 Quantitative Real-time PCR

Die Transkription von *soxL*, *Alvin\_3028* und *Alvin\_0258* im Laufe der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen wurde mittels qRT-PCR untersucht. Als template diente 100 ng RNA, welche aus *A. vinosum* isoliert wurde (2.5.1.4). Das QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) and das iCycler iQ real-time System (BioRad, München, Deutschland) wurden hier nach den Angaben der Hersteller verwendet. Jede RNA-Probe wurde auf DNA-Kontaminationen überprüft, indem in einem Reaktionsansatz die Reverse Transkriptase ausgelassen wurde. Als endogene Kontrolle wurde *Alvin\_0486* amplifiziert, das für eine Uroporphyrinogen-Decarboxylase (Uro-D) kodiert und kein transkriptionellen Änderungen im *Alc. vinosum* Transkriptom aufwies (Weissgerber et al., 2013). Jedes der oben genannten Gene wurde im Dreifachansatz untersucht und die PCR-Bedingungen sahen wie folgt aus:

1.	50 °C	30 min	Reverse Transkription
2.	95 °C	15 min	Inaktivierung der Reversen Transkriptase / Initiale Aktivierung der Polymerase
3.	94 °C	15 sek	Denaturierung
4.	T <sub>a</sub>	30 sek	Anlagerung der Oligonukleotide
5.	72 °C	30 sek	Elongation

Schritt 3-5 wurde 40 x wiederholt

6.	40-100 °C	0,5 °C (30 sek) <sup>-1</sup>	Analyse der Schmelzkurve
----	-----------	-------------------------------	--------------------------

T<sub>a</sub> (*soxL*, *Alvin\_3028*, und *Alvin\_0258*): 64 °C

Die Analyse der Schmelzkurven und die Berechnung des C<sub>t</sub> -Schwellenwertes wurde automatisch durch die Software des iCycler iQ durchgeführt. Relative Exprimierungs-Anteile (R) wurden nach der 2<sup>-ΔΔΔC<sub>t</sub></sup> Methode (Livak and Schmittgen, 2001) berechnet, indem folgende Formeln verwendet wurden:

$$[1] \Delta\Delta C_t = (C_{t,target} - C_{t,Alvin-0486})_{photolithoautotroph} - (C_{t,target} - C_{t,Alvin-0486})_{photoorganoheterotroph}$$

$$[2] R = 2^{-\Delta\Delta\Delta C_t}$$

### 2.5.3 DNA-Transfer

#### 2.5.3.1 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Plasmid-DNA wurde nach Hanahan (1983) in *E. coli* Zellen transformiert. Hierfür wurde 1  $\mu\text{L}$  Plasmid-DNA oder ein vollständiger Ligationsansatz zu 100  $\mu\text{L}$  kompetenten Zellen beigefügt und den Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Hitzeschock (42 °C, 90 sek) und einer Abkühlungsphase für 2 Minuten auf Eis, wurden 500  $\mu\text{L}$  LB Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden dann weiter bei 37 °C für 45-60 Minuten inkubiert, bevor sie auf ein Selektionsmedium ausplattiert und weiterhin bei 37 °C (über Nacht) inkubiert wurden.

#### 2.5.3.2 DNA-Transfer von *E.coli* nach *Alc. vinosum*

Das genetische Material von *Alc. vinosum* kann mittels Konjugationsvorgängen verändert werden (Pattaragulwanit and Dahl, 1995). Hierfür wurden *E. coli* S17-1 Donorzellen über Nacht in LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen. 3 mL RCV Medium wurden anschließend mit dieser Vorkultur angeimpft und inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,1 erreicht wurde, was einer Zelldichte von 10<sup>8</sup>/mL entspricht (Sambrook et al., 1989). *Alc. vinosum* Rif 50 diente als Empfänger und wurde photoorganoheterotroph bis zu einer OD<sub>690</sub> von 1 angezogen, was einer Zelldichte von 8 x 10<sup>8</sup>/mL entspricht (Pattaragulwanit and Dahl, 1995). Ungefähr 12 x 10<sup>8</sup> Zellen wurden geerntet (10.000 x g; 5 min) und zweimalig mit frischem RCV Medium gewaschen, bevor diese in 500  $\mu\text{L}$  RCV Medium resuspendiert wurden. Anschließend wurden 500  $\mu\text{L}$  der *E. coli* Lösung hinzugegeben. Die Zellmischung wurde pelletiert und in einer kleinen Menge RCV-Medium resuspendiert, bevor sie auf einen sterilen Nitrat-Cellulose-Filter (Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$ ; Sartorius, Göttingen, Deutschland) gegeben wurde. Dieser Filter lag wiederum auf einer RCV-Agarplatte, welche anschließend in einem Anaerobentopf für zwei Tage bei 30 °C und Lichteinwirkung inkubiert wurde. Darauf folgte ein vorsichtiges Abspülen der Zellen von dem Filter und die Zellen wurden auf RCV-Phytigel ausplattiert, welche die entsprechenden Antibiotika enthielt, um ein Screening zu garantieren.

Derivate von pK18*mobsacB* wurden verwendet, um eine *in frame* Deletion in *Alc. vinosum* zu erzielen. Da der „Suicide“-Vektor nicht in *Alc. vinosum* repliziert werden kann, wird dieser in das Genom integriert, um eine Resistenz gegen Kanamycin zu entwickeln. Einzel-Crossover-Mutanten wurden für 3 Generationen in Flüssigmedium, ohne Kanamycin, angezogen. Hiermit sollte gewährleistet werden, dass das Vektorrückgrad mittels homologer Rekombination entfernt werden konnte. Die Zellen wurden anschließend auf RCV-Phytigel-Platten gegeben, welche 10 % Saccharose enthielten, um die Expressierung von *sacB* zu induzieren. Das Coenzym Levansucrase SacB ist letal. Wenn Plasmide der pSUP Serie verwendet wurden, konnten Doppel-Crossover-Mutanten anhand ihrer Resistenz gegen Kanamycin und dem Verlust der vektor-kodierten Ampicillin-Resistenz, identifiziert werden. Die Genotypen wurden über Kolonie PCR und Southern Blot verifiziert.

## 2.5.4 Enzymatische DNA-Modifizierungen

### 2.5.4.1 Restriktion von DNA

Der Verdau von DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen (Typ II) von Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. In einem Reaktionsansatz befand sich 0,5-10 µg DNA und 1 U-5 U des entsprechenden Restriktionsenzym. Die Ansätze wurden für eine Stunde bei den von den Herstellern angegebenen Temperaturen inkubiert.

### 2.5.4.2 Alkalische Phosphatase

Für die Konstruktion von Plasmiden wurden entweder die Alkalische Phosphatase aus der Kalbsleber oder die FastAP (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet, um die Phosphatgruppen der linearisierten Plasmide zu entfernen. Hierfür wurde 1 µL des Enzyms direkt zum Restriktionsansatz gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

### 2.5.4.3 Ligation

Die T4 Ligase (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) wurde verwendet, um linearisierte Plasmide mit DNA-Fragmenten zu verbinden. Ligationen wurden für 2 Stunden bei 37 °C oder über Nacht bei 16 °C durchgeführt.

## 2.5.5 DNA Sequenzierung

Erfolgreiche Klonierungen von DNA-Fragmenten in Plasmide wurden durch DNA-Sequenzierungen der Firma GATC (Konstanz, Deutschland) verifiziert.

## 2.5.6 DNA-DNA-Hybridisierung

Southern-Hybridisierung wurde verwendet, um spezifische Sequenzen innerhalb von genomischer DNA zu detektieren und das Vorhandensein von mutierten Sequenzen zu identifizieren (Southern, 1975, 1979).

Zuvor wurde chromosomale DNA aus *Alc. vinosum* Rif50 und der Mutantenstämme isoliert, mit Restriktionsendonukleasen verdaut und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden anschließend auf eine Roti-Nylon plus Membran (Roth, Karlsruhe, Deutschland) über ein Kapillarblot-Verfahren transferiert, nachdem das Agarosegel dokumentiert wurde. Anschließend wurde die Membran zweimal mit 2 x SSC ausgespült und die DNA wurde kovalent an die Membran mittels „UV Cross-Linking“ (Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, USA) gebunden. Die Membran wurde dann in Prä-Hybridisierungs-Lösung für 3 bis 5 Stunden bei 68 °C in einem Hybridisierungsöfen (Biometra, Göttingen, Deutschland) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Für die Hybridisierung wurde die Dig-markierte DNA-Probe, welche die gewünschte Sequenz enthielt, bei 100 °C für 20 Minuten inkubiert, bevor sie in die Prä-Hybridisierungs-Lösung hinzugegeben wurde. Eine Inkubation für 16 bis 18 Stunden bei 68 °C sollte nun die Bindung dieser an die membrangebundene DNA garantieren.

Für die Detektierung der DNA-Probe mittels Chemilumineszenz wurde ein Digoxigenin-spezifischer Antikörper hinzugegeben, welcher wiederum an eine Alkalische Phosphatase (Antidigoxigenin-AP,



Roche, Mannheim, Deutschland) gekoppelt war. Alle weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Prä-Hybridisierungs-Lösung wurde zusammen mit der DNA-Probe entfernt und die Membran zweimal mit 100 mL 2 x SSC + 0,1 % SDS (5 min) gewaschen. Darauf folgte ein zweifacher Waschgang mit 100 mL 0,1 x SSC + 1 % SDS (15 min), gefolgt von einem weiteren Waschgang mit 50 mL Waschpuffer (5 min). Um unspezifische Bindungsstellen zu maskieren, wurde die Membran mit 50 mL Puffer 2 für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde Puffer 2 (15 mL) erneuert und 2 µL Digoxigenin-Antikörper hinzugefügt. Nach 30 Minuten wurde der Puffer entfernt und die Membran zweimal mit 100 mL Waschpuffer (15 min) gewaschen. Die Membran wurde nun mit 30 mL Puffer 3 für 5 Minuten äquilibriert, bevor 10 µL CDP-star (Substrat der Alkalischen Phosphatase) dazugegeben wurde. Die resultierenden Emissionen wurde über einen Röntgenfilm (X-OMAT AR, Kodak, Rochester, USA) detektiert.

### Lösungen:

#### Southern Blot

Depurinierungs-Lösung	0,25 M HCl
Transfer-Lösung	0,4 M NaOH
20 x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7
2 x SSC + 1 % SDS-Page	10 % (v/v) 20 x SSC; 1 % (w/v) SDS

#### Hybridisierung

Puffer 1	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5
Prä-Hybridisierungs-Lösung	20 % (v/v) Puffer 1; 25 % (v/v) 20 x SSC 0,1 % N-Lauroyl-Sarkosin; 0,02 % (w/v) SDS 2 % (w/v) Blocking-Reagenz
0,1 x SSC + 1 % SDS	0,5 % (v/v) 20 x SSC; 1 % (w/v) SDS

#### Detektierung mittels Chemilumineszenz

Puffer 2	1 % Blocking-Reagenz in Puffer 1 (Lagerung bei 4 °C)
Puffer 3	0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; pH 9,5 (Lag. bei 4 °C)
Waschpuffer	0,3 % Tween-20 in Puffer 1

### 2.5.7 Agarosegelelektrophorese und Färbung von DNA

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet (Sambrook et al., 1989). 0,8-1 %ige (w/v) Agarosegele wurden mit TAE-Puffer angefertigt. Um die DNA-Größen zu bestimmen, wurden 1 kb oder 100 p DNA Standards (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland und Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet. Die Gele wurden in 1 x TAE-Puffer gelegt. Nach dem Auftragen der DNA-Proben und der Standards fand die Auftrennung bei 80 V statt. Anschließend wurden die Gele mit GelRed (1 µg/ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>; Biotium, Hayward, USA) gefärbt und die DNA wurde bei einer Wellenlänge von 264 nm detektiert, indem ein UV-Transilluminator (INTAS, Göttingen, Deutschland) verwendet wurde.

### Lösungen

10 x Probenpuffer: 0,25 % Bromphenolblau, 40 % Saccharose

50 x TAE Puffer: 2 M TrisHCl, 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA, pH 8

## 2.6 Proteinbiochemische Methoden

### 2.6.1 Zellyse

Zellen wurden mittels Ultraschall (Cell Disruptor B15, Branson, Danbury, USA) aufgeschlossen. Hierfür wurden diese im entsprechenden Puffer resuspendiert (1 g Nassgewicht / 6 mL) und der Aufschluss erfolgte für 1,5 min/mL bei einer 50%igen Intensität und 4 °C. Die entstandene Extraktion wurde abzentrifugiert (25.000 x g; 4 °C; 30 min), um unaufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer vom Überstand abzutrennen, in welchem sich die rekombinanten Proteine befanden.

### 2.6.2 Ultrazentrifugation

Um Membranfraktionen zu isolieren, wurde der Protein-Rohextrakt einer Ultrazentrifugation unterzogen (145.000 x g; 4 °C). Für Extrakte aus *E. coli* wurde eine Zentrifugationszeit von 2 Stunden gewählt, wohingegen diese auf 4 Stunden erhöht wurde, wenn *Alc. vinosum* Extrakte verwendet wurden. Nach der Zentrifugation befanden sich die Membranfraktionen im Pellet, wohingegen der Überstand lösliche Proteine enthielt.

### 2.6.3 Solubilisierung von Membranproteinen

Für die Solubilisierung von Membranproteinen wurde das Pellet (aus der Ultrazentrifugation) in Lyse-Puffer resuspendiert, welcher 1 % Triton X-100 enthielt und in diesem auf Eis über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung einer erneuten Ultrazentrifugation unterzogen und das entsprechende Protein aus dem entstandenen Überstand aufgereinigt.

### 2.6.4 Aufreinigung rekombinanter Proteine

#### 2.6.4.1 His-Tag Aufreinigung

Proteine, die an ein His-Tag fusioniert wurden, konnten mittels Metall-Affinitätschromatographie aufgereinigt, indem NTA-Agarose verwendet wurde. Hierfür wurde die Agarose mit 6 SV (Säulenvolumen) Lyse-Puffer äquilibriert bevor der Protein-Rohextrakt auf die Säule hinzugegeben wurde. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 3 SV Elutionspuffer von der Säule gewaschen, welcher 10, 20, 50 bzw. 75 mM Imidazol enthielt. Die Elution erfolgte mit 2 SV Elutionspuffer und variierenden Imidazolkonzentrationen (100 - 500 mM).

Lyse-Puffer		Elutionspuffer	
50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
300 mM	NaCl	300 mM	NaCl
10 mM	Imidazol	10-500 mM	Imidazol
pH 8		pH 8	

#### 2.6.4.2 Strep-Tag Aufreinigung

Das Strep-Tag bindet sehr spezifisch an Strep-Tactin, womit eine sehr effiziente Aufreinigung von Proteinen möglich ist, welche an ein Strep-Tag fusioniert wurden. Dieses Verfahren wurde mit Säulen durchgeführt. Hierfür wurde die Agarose mit 4 SV Puffer W äquilibriert und anschließend der Protein-Rohextrakt auf diese gegeben. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 5 SV Puffer W von der Säule gelöst, wohingegen die gewünschten Proteine mit 6 x 0,5 SV Puffer E eluiert, welches Desthiobiotin enthielt.

Puffer W		Puffer E	
100 mM	Tris-HCl		Puffer W
150 mM	NaCl	2,5 mM	Desthiobiotin
pH 8			

#### 2.6.5 Entsalzung von Protein-Lösungen

##### 2.6.5.1 Dialyse

Um Proteinlösungen zu dialysieren wurden diese in Dialyseschläuche gegeben (MWCO 3.500 Da oder 6.000 - 8.000 Da, Serva, Heidelberg, Deutschland) und in 2 L des entsprechenden Puffers gelegt. Unter leichtem Rühren und bei 4 °C fand die Dialyse für 16 bis 18 Stunden statt. Die Dialyseschläuche wurden zuvor autoklaviert und mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gespült.

##### 2.6.5.2 Gelfiltration

Eine weitere Entsalzungsmethode stellte die Verwendung von PD MiniTrap G25 Säulen (GE Healthcare, München, Deutschland) dar. Die Säulen wurden mit 3 SV Puffer äquilibriert, bevor maximal 500 µL der Proteinlösung auf diese gegeben werden konnte. Die anschließende Eluierung fand mit dem entsprechenden Puffer statt.

#### 2.6.6 Quantifizierung von Proteinen

##### 2.6.6.1 Fällung von Proteinen mittels Aceton

Im Falle des Membranproteins Alvin\_3028, welches mittels Solubilisierungsdetergenzien behandelt wurde, mussten die aufgereinigten Fraktionen zunächst vorbehandelt werden, da diese Detergenzien (hier: Triton X100) den Proteinnachweis mittels BCA verfälschen können.

Hierfür wurde die jeweilige Fraktion 1:10 mit eiskaltem Aceton gemischt und für 30 Minuten bei - 20 °C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation (13.000 x g; 5 min.; 4 °C), um das Proteinpellet zu

erhalten und folglich für 5 Minuten an Luft zu trocknen. Die Pellets wurden anschließend in 50  $\mu\text{L}$   $\text{rH}_2\text{O}$  resuspendiert und die Quantifizierung mit BCA konnte durchgeführt werden.

### 2.6.6.2 Quantifizierung nach Bradford

Proteinkonzentrationen innerhalb von *Alc. vinosum* Kulturen wurden mit Bradford-Reagenz bestimmt (Bradford, 1976). Hierfür wurde 1 mL Kultur pelletiert und in 1 M NaOH-Lösung resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 95 °C (5-10 min) aufgeschlossen, Zelltrümmer sedimentiert (13.000 x g; 3 min) und 25  $\mu\text{L}$  des Überstandes, in welchem sich die Proteine befanden, mit 750  $\mu\text{L}$  Bradford gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten im Dunkeln wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Eine Standardkurve wurde mit dem Einsatz von BSA erhalten (0-1,4 mg / mL).

### 2.6.6.3 Quantifizierung mit BCA

Die Konzentration aufgereinigter Proteinlösungen wurden mittels BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) bestimmt, indem die Angaben der Hersteller befolgt wurden. Die Kalibrierungskurve wurde mit BSA ermittelt (0-500  $\mu\text{g}$  / mL).

### 2.6.7 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Um die Konzentrationen von Proteinlösungen zu erhöhen wurden diese auf ein „Centriplus Centrifugal Filter Device“ (Millipore, Schwalbach, Deutschland) gegeben. Die Lösungen wurden in dieser Apparatur zentrifugiert (3.000 x g; 4 °C) bis das gewünschte Volumen erreicht wurde. Für kleinere Volumina wurde der Vivaspin 500 Zentrifugationskonzentrator (Sartorius, Göttingen, Deutschland) verwendet (13.000 x g; 4 °C).

## 2.7 Detektierung der Schwefelbindung

### 2.7.1 Detektierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Um die Schwefelbindefähigkeit von Proteinen zu untersuchen wurden ca. 30  $\mu\text{M}$  rekombinantes Protein mit 10 mM NaSH für eine Stunde bei 30 °C in einem finalen Volumen von 100  $\mu\text{L}$  (Puffer A) inkubiert. Ebenfalls wurden Thiosulfat und GSSH als Substrate verwendet. Letzteres wurde generiert, indem 500  $\mu\text{M}$  oxidiertes Glutathion mit 450  $\mu\text{M}$  Sulfid für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert wurde (Rohwerder and Sand, 2003). Um eine mögliche Schwefeltransferase-Aktivität zu detektieren wurde das Schwefel-übertragende Protein wie oben beschrieben mit Sulfid inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Sulfid entweder über Gelfiltration mittels PD Mini-Trap Säulen (GE Healthcare, München, Deutschland) oder Dialyse (in Puffer B), entfernt.

Für die MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde Puffer B gegen Puffer C mittels PD Mini-Trap Säulen ausgetauscht. Die Proben wurden mit 0,1 %-iger Trifluoressigsäure (in  $\text{H}_2\text{O}$  *reinst*) 1:5 verdünnt und mit einem Volumen an Matrix gemischt. Hierfür wurde Alpha-Cyano-4-Hydroxy-Zimtessig und Sinapinsäure verwendet. Die Matrizen wurden in 0,1 %-iger Trifluoressigsäure (in Acetonitril) gelöst. Verdünnte Proben wurden mit der gelösten Matrix in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und 1  $\mu\text{L}$  der Mischung wurde auf eine MPT 384 Platte TF (BrukerDaltonik GmbH, Leipzig,

Deutschland) gegeben. Die Spektren wurden in einem linear, positiven Modus, innerhalb einem Bereich von 2 kDa bis 20 kDa gemessen, indem das Biflex III (BrukerDaltonik GmbH, Leipzig, Deutschland) verwendet wurde.

<b>Puffer</b>		
<b>Puffer A</b>	Tris-HCl	50 mM (pH 7,5)
	NaCl	100 mM
<b>Puffer B</b>	Tris-HCl	50 mM (pH 7,5)
	NaCl	50 mM
<b>Puffer C</b>	HEPES	10 mM (pH 7,5)

### 2.7.2 Detektierung mittels 1,5-I-AEDANS

1,5-I-AEDANS (5-[2-(2-Iodacetamido)ethylamino]-naphthalin-1-sulfonsäure) ist ein fluoreszierendes Reagenz, das spezifisch an Thiolgruppen bindet, indem eine Iodid-Gruppe gegen das Schwefel der Thiolgruppe ausgetauscht wird ((Zheng et al., 1994; Thomé et al., 2012). Um Persulfide zu detektieren wurde das Protokoll nach Thomé et al. (2012) angewendet. Hier werden mit 1,5-I-ADAENS markierte Proteine, welche dann selbst fluoreszieren, über SDS-Page und anschließender UV-Licht-Bestrahlung, detektiert. Hierbei kann nicht zwischen Proteinen unterschieden werden, die sich entweder in der Thiol- oder persulfurierten Form befinden. Um dies zu gewährleisten, mussten die Proben mit DTT behandelt werden, bevor sie der Elektrophorese ausgesetzt wurden (Thomé et al., 2012). DTT ist in der Lage die Disulfidbrücke innerhalb der Persulfidgruppe zu spalten, womit das zusätzlich gebundene 1,5-I-ADAENS ebenfalls vom Protein abgespalten wird und die Fluoreszenz der Proteinbande abnimmt. Im Gegensatz dazu kann DTT nicht die Thiolgruppe angreifen und die Fluoreszenz bleibt bestehen. Für die Experimente wurden drei unterschiedliche Ansätze benötigt:

1. Die Proteine wurden aufkonzentriert und mit 2  $\mu$ M 1,5 - I-ADAENS bei 4 °C für eine Stunde im Dunkeln inkubiert.
2. Die Proteine wurden mit 10 mM NaHS für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Anschließend folgte eine Dialyse, um überschüssiges Sulfid zu entfernen und die Proteine wurden ebenfalls aufkonzentriert, bevor 1,5-I-AEDANS hinzugegeben wurde.
3. Die Hälfte der Proteinprobe aus dem zweiten Teil wurde dialysiert und anschließend mit 10 mM DTT für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiges DTT wurde dann mit PD Mini Trap Säulen (GE Healthcare, München, Deutschland) entfernt. Die Proteinproben wurden erneut aufkonzentriert, bevor sie der 1,5-I-AEDANS-Behandlung unterzogen wurden.

Nach der einstündigen 1,5-I-AEDANS-Behandlung wurden 0,77 mM Cystein hinzugegeben (30 min; RT), damit überschüssiges Reagenz von diesem abgefangen werden konnte. Die Hälfte der Probe wurde unbehandelt weiter verarbeitet, wohingegen der andere Teil erneut mit 7 mM DTT (30 min; RT) behandelt wurde. Alle Proteinproben wurden anschließend mit 1  $\mu$ L nativem Ladepuffer versetzt und auf ein 15 %iges Laemmli-Gel gegeben, welches im Dunkeln laufen gelassen wurde. Zu erwähnen ist, dass der pH des Trenngels auf 9,5 eingestellt wurde, um eine verbesserte Auftrennung

der Proteine zu gewährleisten. Die Fluoreszenz der Proteine wurde anschließend unter UV-Licht analysiert, dokumentiert und die Gele konnten dann mit Coomassie-Brilliant Blue gefärbt werden, um die Proteinmengen der einzelnen Proben miteinander zu vergleichen.

### Lösungen

1,5-I-AEDANS	0,5 mM (in 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,5)
Cystein	100 mM
DTT	200 mM
Puffer D	10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 100 mM NaCl

## 2.8 Bestimmung enzymatischer Reaktionen

### 2.8.1 Bestimmung der Aktivitäten von Fusionsproteinen

Um die zelluläre Orientierung des C-Terminus von Alvin\_3028 zu detektieren wurde dieses Membranprotein mit einer Alkalischen Phosphatase und einer Glucuronidase fusioniert. Anschließend sollten die Aktivitäten der Fusionsproteine bestimmt werden.

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde modifiziert nach Bessey et al. (1946) gemessen. *E. coli* -Zellkulturen (Zellen enthielten Plasmide mit Fusionsproteinen, als auch Kontrollplasmide) wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 vermehrt, bevor die transkriptionelle Induktion mittels 0,5 mM IPTG erfolgte. Nach zwei Stunden wurden je 100 µL der Zellen mit 900 µL TrisHCl-Puffer (1 M; pH 8) gemischt und 30 µL Chloroform und 20 µL 0,1 %igem SDS hinzugegeben. Die Mixtur wurde für 2 Minuten bei 30 °C inkubiert, bevor 1 mM des Substrats *p*-Nitrophenyl Phosphat (pNPP) hinzugegeben wurde, um die Reaktion zu starten. Die Reaktionszeiten beliefen sich von 5 bis zu 120 Minuten. Die jeweiligen Reaktionen wurden mittels 200 µL 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung gestoppt. Nach Zentrifugation der Zellen (13.000 x g; 2 min) wurde der gelb gefärbte Überstand spektrometrisch bei 405 nm untersucht. Der Glucuronidase Assay wurde modifiziert nach Aich et al. (2001) durchgeführt, welches die gleichen Schritte wie oben beschrieben enthielt. Hier wurde allerdings 1 mM pNPG (*p*-Nitrophenyl β-D-Glucuronid) verwendet und der Überstand bei 415 nm untersucht. Die Aktivitäten der Enzyme wurden in Miller-Units angegeben, welche sich folgendermaßen berechnen ließen:

$$1 \text{ Miller Unit} = 1000 * \left( \frac{\text{Abs}}{t * v * A600} \right)$$

t = Reaktionszeit in Minuten

v = Volumen (mL) der Kultur, verwendet im Assay

### 2.8.2 Bestimmung der Thiosulfat:Cyanid- bzw. Glutathionpersulfid:Cyanid-Schwefeltransferaseaktivität

Die Thiosulfat:Cyanid-Schwefeltransferaseaktivität (Rhodaneseaktivität) wurde nach Ray et al. (2000) bestimmt. Diese Aktivität beruht auf den katalytischen Transfer einer Persulfidgruppe, ausgehend von Thiosulfat, auf Cyanid. Hierbei werden Sulfit und Thiozyanat (SCN) gebildet (**Abb 2.3**). Thiozyanat kann wie folgt quantifiziert werden: Der Versuchsansatz mit einem Volumen von

500  $\mu\text{L}$  enthielt 500 mM Glycin-Puffer (pH 9,5), 50 mM Natriumthiosulfat, 50 mM NaCN und Enzym. Die Reaktion wurde gestartet, indem NaCN hinzugegeben wurde und der Ansatz wurde für 1 Minute bei 30 °C inkubiert. Mit der Zugabe von 250  $\mu\text{L}$  15%igem Formaldehyd wurde die Reaktion gestoppt und 750  $\mu\text{L}$  Eisen-Nitrat-Reagenz (25 g  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$  und 50 mL 65 %  $\text{HNO}_3$  pro 375 mL) wurden hinzugegeben. Die Absorption wurde bei 460 nm gemessen. Ein Unit ist gleich der Menge an Protein, welche die Produktion von 1  $\mu\text{mol}$  Thiozyanat katalysiert. Alternativ wurde GSSH als Substrat getestet, welches zuvor synthetisiert wurde. Hierfür wurden 500 mM oxidiertes Glutathion mit 500 mM Sulfid für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert (Rohwerder and Sand, 2003).

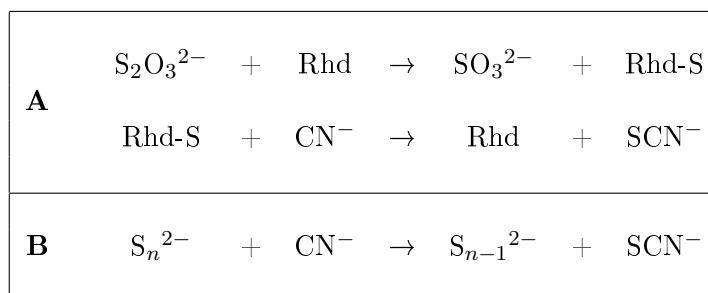


Abbildung 2.3: **Schematischer Überblick der Schwefeltransferase-Aktivität.** A Charakteristische Rhodanese (Thio-sulfate:Cyanid) Schwefeltransferaseaktivität. B Polysulfid:Cyanid Schwefeltransferaseaktivität.

### 2.8.3 Schwefeltransfer von Polysulfiden zu Cyanid

Der Schwefeltransfer von Polysulfiden zu Cyanid (**Abb. 2.3**), katalysiert durch die Schwefeltransferasen Alvin\_0258 und Alvin\_3028, wurde nach Klimmek et al. (1991, 1998) bestimmt, indem die Abnahme der Absorption von Polysulfiden bei 360 nm gemessen wurde. Die gelbliche Polysulfidlösung wurde zunächst unter anaeroben Bedingungen in 50 mM TrisHCl (pH 8,3) mit 8 mM  $\text{Na}_2\text{S}$  und 2 mM  $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$  hergestellt. Auch die Reaktion verlief anoxisch mit der Zugabe von Protein, welche wiederum mit 10 mM  $\text{CN}^-$  gestartet wurde. 1 Unit der Enzymaktivität entspricht dem Verbrauch von 1  $\mu\text{mol}$  Polysulfiden in Abhängigkeit der Proteinkonzentration und der Zeit.

### 2.8.4 Die Aktivitätsmessung des rekonstituierten Sox-Systems

Für die vollständige Rekonstituierung des Sox Systems wurden SoxB, SoxYZ und SoxL wie in Welte et al. (2009) beschrieben heterolog produziert und aufgereinigt. Die Aufreinigung von SoxXAK wurde im Laufe der Bachelorarbeit von Christina Molitor (2013) modifiziert bis ein stabiler und mit Häm beladener Proteinkomplex erhalten werden konnte.

Die rekombinanten Proteine wurden dann in einem modifizierten Sox Assay untersucht, welcher auf eine Thiosulfat-abhängige Reduktion des Pferdeherz-Cytochrome *c* basiert (Welte et al., 2009) und die folglich Erhöhung der Absorption bei 550 nm verfolgt werden kann. Die Reaktion fand in 50 mM TrisHCl-Puffer (pH 7,5) bei 30 °C statt und die hierfür notwendigen Enzyme (1  $\mu\text{M}$  SoxYZ, 0,05  $\mu\text{M}$  SoxB, 0,25  $\mu\text{M}$  SoxXAK) wurden zusammen mit 35  $\mu\text{M}$  Cytochrom *c* und 100  $\mu\text{M}$  Thiosulfat in eine Küvette gegeben. Die Reaktion wurde standardmäßig mit 1  $\mu\text{M}$  SoxYZ gestartet und in einem UV/Vis Spektrophotometer (Specord 210, Analytik Jena, Jena, Deutschland) untersucht. Alternativ wurde aktiviertes SoxYZ verwendet. Hierfür wurde das Protein mit 10 mM Sulfid (30 °C; 1 h) inkubiert und anschließend einer Dialyse in 10 mM TrisHCl-Puffer (pH 7,5) unterzogen, um das überschüssige Sulfid zu entfernen. Dieses hätte einen Einfluss auf die Reaktion nehmen können,

da Sulfid allein schon eine vollständige Reduktion des Cytochrome *c* bewirkt. Die Aktivität des Sox-Systems wurde definiert als die Extinktionsänderung in Abhängigkeit der Zeit ( $m(\Delta E/\text{min})$ ).

## 2.9 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

### 2.9.1 SDS-Page

Für die Auftrennung von Proteinen mittels diskontinuierlicher SDS-Page (Laemmli, 1970) wurde das Bio-Rad Mini Protean System (Bio-Rad Mini Protean System, München, Deutschland) verwendet.

#### Lösungen

Puffer A	1,5 M Tris-HCl; pH 8,8; 0,3 % (w/v) SDS
Puffer B	0,5 M Tris-HCl; pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS
Acrylamid-Lösung	30 % Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1)
Probenpuffer (reduzierend)	4 x Rotiload
2 x Probenpuffer (n. reduzierend)	100 mM Tris-HCl; pH 6,8; 4 % SDS; 0,001 % Bromphenolblau; 20 % (v/v) Glycerin
2 x Probenpuffer (nativ)	2 M Saccharose; 1 % (w/v) Bromphenolblau
5 x Elektrophoresepuffer	15 g Tris; 72 g Glycin; 5 g SDS; ad 1 L $\text{H}_2\text{O}_{dest}$

Trenn- und Sammelgele wurden hergestellt, indem entsprechende Volumina  $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ , Puffer A bzw. Puffer B, APS und TEMED so ins Verhältnis gesetzt wurden, dass 7,5 bis 15 %ige Gele entstanden.

	Trenngel			Sammelgel
	7,5 %	12,5 %	15 %	4,5 %
$\text{H}_2\text{O}_{dest}$	6 mL	4 mL	3 mL	3 mL
Puffer A	3 mL	3 mL	3 mL	-
Puffer B	-	-	-	1,25 mL
Acrylamid	3 mL	5 mL	6 mL	750 $\mu\text{L}$
APS (10 %)	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
TEMED	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$

Die Proteinproben wurden mit 4 x Rotiload gemischt und für 5 Minuten bei 100 °C aufgeköcht oder mit 2 x nicht-reduzierendem Puffer versetzt, um mögliche Disulfidbrückenbindungen nachzuweisen. Nachdem das Gel mit den Proteinproben beladen wurde, konnte die Elektrophorese bei 60 V starten. Als die Proteine das Trenngel erreichten, konnte die Spannung auf 100 V erhöht werden. Der PageRuler Prestained Protein Ladder (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) diente als Standard. Für die Bestimmung möglicher Persulfidbindungen wurde der pH des Trenngels auf 9,5 eingestellt und die Proteinproben wurden mit nativem Puffer versetzt.



### 2.9.2 Native-Page

Die Native-Page fand Verwendung, um die Formierung von Proteinkomplexen zu untersuchen. Hier wurde ebenfalls das Laemmli System (Laemmli, 1970) verwendet, wobei SDS aus allen Puffern entfernt wurde. Alle resultierenden Gele waren 7,5 %ig und die Elektrophorese fand bei 12 mA und 4 °C statt.

### 2.9.3 Western-Blot

In einigen Fällen wurden die Proteine, welche zuvor mittels SDS-Page aufgetrennt wurden, zusätzlich auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hierfür wurde die Membran zunächst für 15 Minuten in Towbin-Puffer (1,52 g Tris-HCl, 7,2 g Glycin, add 400 mL  $H_2O_{dest}$  + 100 mL Methanol; pH 8,3) äquilibriert und das benötigte Whatman-Papier ebenfalls in diesem Puffer angefeuchtet, bevor der Blot in einer „Transblot Semi-Dry“- Transferzelle (BioRad, München, Deutschland) bei 15 V für 45 Minuten durchgeführt wurde.

### 2.9.4 Visualisierung von Proteinen

#### 2.9.4.1 Anfärbung von Proteinen auf SDS-Gelen

Nachdem die Proteine aufgetrennt wurden, konnten die Gele mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt werden. Nach 60-minütiger Färbung wurden die Gele in eine Entfärbelösung überführt, welche regelmäßig erneuert wurde, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Anschließend wurden die Gele getrocknet (Aldo-Xer Gelrockner; Schutt; Göttingen, Deutschland).

<b>Färbelösung</b>	
Methanol	50 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R250	0,25 % (w/v)
$H_2O_{dest}$	40 % (v/v)
<b>Entfärbelösung</b>	
Methanol	20 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
$H_2O_{dest}$	70 % (v/v)

Mittels Silberfärbung konnten weiterhin sehr niedrig konzentrierte Proteine auf SDS-Gelen sichtbar gemacht werden (Blum et al., 1987). Hierfür wurden die benötigten Lösungen immer frisch angesetzt oder bei 4 °C gelagert. Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt: Das SDS-Gel wurde für eine Stunde in Fixierlösung inkubiert und anschließend dreimal für eine Minute mit Ethanol (50 %, v/v) gewaschen. Daraufhin erfolgte eine Inkubation in Thiosulfatlösung für eine Minute, bevor das Gel erneut für jeweils 10 Sekunden (3x) mit  $H_2O_{dest}$  gewaschen wurde. Eine 20-minütige Inkubation in Imprägnierlösung folgte, bevor das Gel erneut mit destilliertem Wasser gewaschen wurde. Anschließend wurde das Gel solange in Entwicklerlösung gelegt, bis Proteinbanden deutlich

zu erkennen waren. Um die Farbentwicklung zu stoppen, wurde das Gel mit  $\text{H}_2\text{O}_{dest}$  und 5%iger Eisessiglösung gewaschen.

<b>Fixierlösung</b>		<b>Imprägnierlösung</b>	
Methanol	500 ml	$\text{AgNO}_3$	2 g
Essigsäure	120 ml	Formaldehyd (37 % [v/v])	0,75 ml
Formaldehyd (37 % [v/v])	0,5 ml	$\text{H}_2\text{O}_{dest}$	add 1000 ml
$\text{H}_2\text{O}_{dest}$	add 1000 ml	Lagerung bei 4 °C	

<b>Thiosulfatlösung</b>	
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{H}_2\text{O}_{dest}$	1000 ml
Lagerung bei 4 °C	

<b>Entwicklerlösung</b>	
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	60 g
Formaldehyd (37 % [v/v])	0,5 ml
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	4 mg
$\text{H}_2\text{O}_{dest}$	add 1000 ml
Lagerung bei 4 °C	

#### 2.9.4.2 Protein-Antikörper-Konjugatfärbung

Rekombinante Proteine, welche einen His-Tag besaßen, konnten nach Transfer auf einer Nitrocellulosemembran, mittels Protein-Antikörper-Konjugatfärbung detektiert werden (Sambrook et al., 1989). Hierfür wurde die Membran in TBS-Puffer für 10 Minuten gewaschen, bevor diese in TBS-Puffer (+ 5 % Milchpulver) meist über Nacht inkubiert wurde. Anschließend erfolgten 10-minütige Waschschrte in TBSTT- und TBS-Puffer, bevor der primäre monoklonaler HisTag-Antikörper (Novagen, Darmstadt) hinzugegeben (1:1000 in Block-Puffer) und die Inkubation der Membran für eine Stunde durchgeführt wurde. Es folgten erneut 10-minütige Waschschrte in TBSTT- und TBS-Puffer. Der sekundäre Anti-Maus-IgG Antikörper, gekoppelt an einer Meerrettich-Peroxidase, wurde anschließend hinzugegeben (1:5000 in Block-Puffer) und die Membran wurde erneut für eine Stunde in dieser Lösung inkubiert. Fünf wiederholte Waschschrte mit TBSTT-Puffer folgten, bevor die Entwicklerlösung hinzugegeben wurde. Die Farbentwicklung konnte mit  $\text{H}_2\text{O}_{dest}$  gestoppt werden.

<b>10x TBSTT-Puffer</b>		<b>20 x TBS</b>		<b>Block-Puffer</b>	
NaCl	5 M	NaCl	3 M	TBS	33,3 mL
TrisHCl	200 mM	TrisHCl	200 mM	BSA	1 g
Triton X-100	2 % [v/v]	pH 7,5			
Tween 20	0,5 % [v/v]				
pH 7,5					

### 3 Ergebnisse

Die vollständige Sequenzierung der Genomsequenz von *Allochromatium vinosum* (Weissgerber et al., 2011) ermöglichte die Identifizierung von drei Genen, welche als potentielle, periplasmatische Schwefeltransferasen annotiert wurden: Alvin\_3028, Alvin\_0258 und *soxL* (**Tabelle 3.1**). Die resultierenden Schwefeltransferasen SoxL und Alvin\_0258 befinden sich vermutlich im Periplasma, da die Gensequenz ein kodierendes Signalpeptid beinhaltet, dass für den Transport in dieses Zellkompartiment verantwortlich ist. Die Gensequenz von Alvin\_3028 deutet an, dass das Protein teilweise in der Membran gebunden vorliegt. Ein großer Teil des C-Terminus, welcher auch das aktive Zentrum beinhaltet, scheint allerdings frei im Periplasma vorzuliegen, womit auch dieses Protein in dieser Studie mit einbezogen wurde. Alvin\_0258 und Alvin\_3028 zeigen starke Homologien zu den Rhodanesedomänen, die von Bordo and Bork (2002) beschrieben wurden. Im Gegensatz dazu, unterscheidet sich die Rhodanesedomäne von SoxL sehr stark von dieser und es konnte im Vorfeld keine Thiosulfat- bzw. Mercaptopyruvat-Aktivität nachgewiesen werden (Welte et al., 2009). Allerdings deutet der genomische Kontext eine Beteiligung am Schwefelstoffwechsel an, da sich *soxL* stromabwärts von *soxXAK* befindet, wie im Späteren näher beschrieben wird. Für diese Arbeit wurden diese drei annotieren, periplasmatischen Schwefeltransferasen genauer untersucht bzw. charakterisiert, um einen möglichen Einfluss im Schwefelmetabolismus von *Alc. vinosum* zu eruieren.

Tabelle 3.1: **Annotierte, periplasmatische Rhodanese-Proteine in *Alc. vinosum***

Name / Gen	Vorausgesagte Lokalisierung	Berechnete Größe [Mol] +/- Signalpeptid	Sequenz des aktiven Zentrums <sup>1</sup>
SoxL (Alvin_2171)	Periplasma, löslich	24644 / 22170	CNGIWCP
Alvin_0258	Periplasma, löslich	15616 / 12939,8	CRTGNR
Alvin_3028	Membrangebunden, aktives Zentrum vermutlich im Periplasma	15459,0 / -	CRSGAQ

<sup>1</sup>Aminosäure-Abfolge, die als Rhodanesedomäne erkannt und mit der Rhodanesedomäne **CRXGX[R/T]**, beschrieben von Bordo and Bork (2002), verglichen wurde. Übereinstimmende Aminosäuren wurden hervorgehoben.

#### 3.1 Untersuchungen zur putativen Schwefeltransferase Alvin\_3028

Die annotierte Schwefeltransferase Alvin\_3028 wurde zunächst mit bioinformatischen Programmen untersucht, um sich einen generellen Eindruck über die Genumgebung und die mögliche Funktion zu verschaffen. Weiterhin wurde mittels qRT-PCR eine mögliche Regulation des Gens während der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen näher untersucht und mit den Ergebnissen der Microarray-Assays von Weissgerber et al. (2013) verglichen. Auch die Fähigkeit Schwefel zu transferieren wurde ermittelt, indem das Protein in *E. coli* heterolog exprimiert und via His-Tag

Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend einem Rhodanese-Assay unterzogen wurde. Ferner wurde die genaue Lokalisierung des C-Terminus, welcher das katalytische Cystein beinhaltet, experimentell mit fusionierten Reporterproteinen bestimmt.

### 3.1.1 Bioinformatische Analysen zu Alvin\_3028

Das Gen Alvin\_3028 kodiert für eine potentielle Schwefeltransferase mit einer charakteristischen Rhodanese-Domäne (hier: CRSGAQ), welche am C-Terminus positioniert ist. Ein zusätzliches Cystein an Position 107 konnte identifiziert werden. Die Verwendung der Programme „TMHMM, SOSUI, PHOBIUS“ ergab eine mögliche Bindung des N-Terminus in der Membran, wohingegen der Rest des Proteins löslich zu sein scheint. Die Programme lieferten allerdings widersprüchliche Ergebnisse zur Lokalisierung des katalytischen Cysteins, denn anhand der Computeranalysen konnte nicht geklärt werden, ob sich die Rhodanese-Domäne im Periplasma oder Cytoplasma befindet.

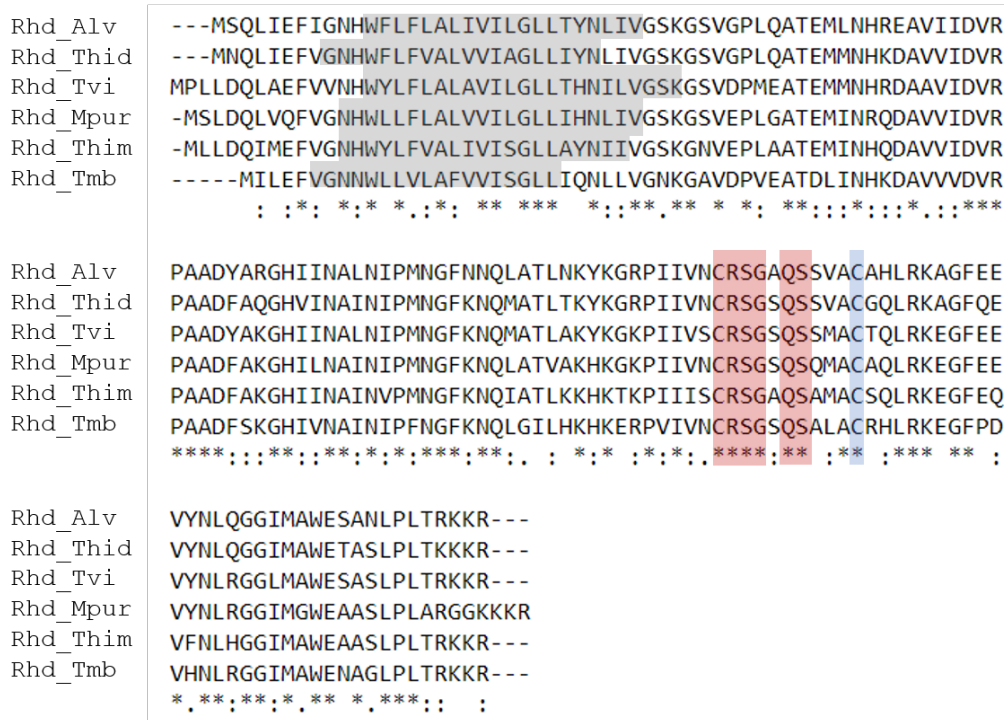


Abbildung 3.1: **Sequenzvergleiche von membrangebundenen Rhodanesen aus verschiedenen schwefeloxidierenden Bakterien, welche zu der Familie der Chromatiaceae gehören.** Sequenzvergleiche wurden mit ClustalW erzeugt (Chenna et al., 2003). Rhd: Rhodanese; Alv: *Allochromatium vinosum*; Thid: *Thiorhodococcus drewsii*; Tvi: *Thiocystis violascens*; Mpur: *Marichromatium purpuratum*; Thim: *Thiocapsa marina*; Tmb: *Thioflavicoccus mobilis*; (\* - Stern): konservierte Reste; (: - Doppelpunkt): Konservierung zwischen Aminosäuren mit sehr ähnlichen Eigenschaften; (, - Punkt): Konservierung zwischen Aminosäuren mit weniger ähnlichen Eigenschaften. Die Rhodanese-Domäne ist mit rot hervorgehoben, wohingegen das zusätzliche Cystein mit blau unterlegt ist. Die membrangebundenen Bereiche sind grau unterlegt.

Der Vergleich der Proteinsequenzen mit Sequenzen aus diversen Datenbanken („BLASTp“) zeigte, dass Proteine mit sehr ähnlichen Aminosäureabfolgen ausschließlich in schwefeloxidierenden Bakterien gefunden wurden, welche zu der Familie der Chromatiaceae gehören. Dazu gehörten annotierte Schwefeltransferasen aus *Thiocystis violascens* DSM 198 oder *Thiorhodococcus drewsii* (Tabelle

3.2), welche ebenso eine charakteristische Rhodanese-Domäne besitzen. Diese Proteine scheinen ebenfalls in der Membran über eine einzelne Transmembran-Helix verankert zu sein (Abb. 3.1). Der Proteinsequenz-Vergleich mit Sequenzen aus der Familie der Ectothiorhodospiraceae (*Halorhodospira halophila*, *Thioalkalivibrio sulfidiphilus*) zeigte wiederum geringe Identitäten von ungefähr 30 % (Tabelle 3.2), wobei alle angegebenen Proteine ebenfalls als Rhodanesen annotiert sind und eine Transmembran-Helix am N-Terminus besitzen. Weiterhin wurde die Genumgebung von Alvin\_3028 untersucht und mit den Genumgebungen der ähnlichen Proteine (Chromatiaceae, Ectothiorhodospiraceae) verglichen (Abb. 3.2).

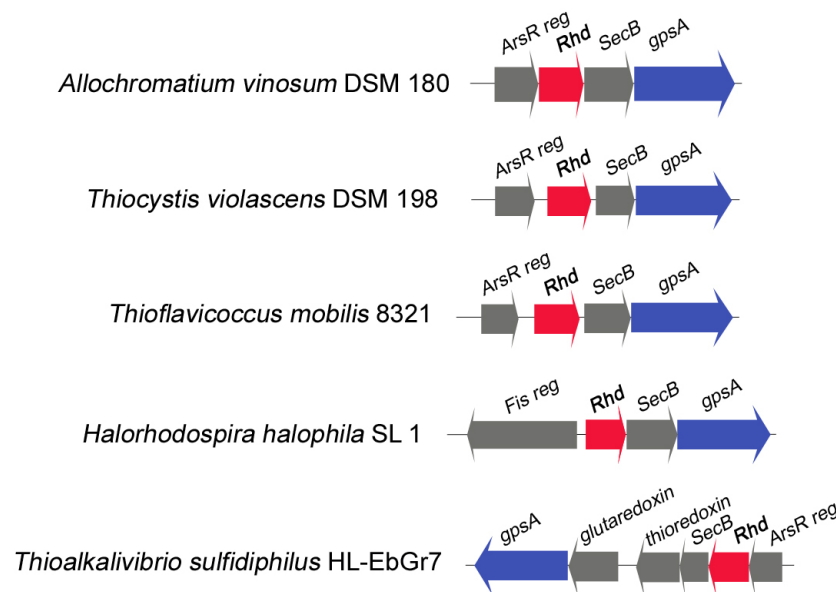


Abbildung 3.2: **Die Genumgebung von Alvin\_3028 und ähnlichen Proteinen aus verschiedenen schwefeloxidierenden Bakterien.** **ArsR reg:** Transkriptioneller Regulator der ArsR Familie; **Rhd:** Protein mit Rhodanese-Domäne (rot); **SecB:** Protein-Export Protein SecB; **GpsA:** Glycerin-3-phosphate Dehydrogenase (blau). Abgeleitete Abbildungen wurden mittels "Genome map" Tool von "KEGG" hergestellt. Analyzierte Genregionen von *Allochrochromatium vinosum* DSM 180: Alvin\_3027-Alvin\_3030, *Thiocystis violascens* DSM 198: Thivi\_2787-Thivi\_2790, *Thioflaviccoccus mobilis* 8321: Thimo\_3671-Thimo\_3674, *Halorhodospira halophila* SL 1: Hhal\_1211-Hhal\_1214, *Thioalkalivibrio sulfidiphilus* HL-EbGr7: Tgr7\_3281-Tgr7\_3286).

In *Alc. vinosum* liegt stromaufwärts von Alvin\_3028 ein Gen, das für einen transkriptionellen Regulator der ArsR Familie kodiert. Stromabwärts wurde ein Gen identifiziert, welches als Protein-Export-Protein (SecB) annotiert wurde. In allen untersuchten Genumgebungen von Proteinen, die Ähnlichkeiten zu Alvin\_3028 aufwiesen, konnten ähnliche Gene gefunden werden. Weiterhin wurde in allen Genumgebungen ein Gen für eine Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase (*gpsA*) identifiziert. In der Genomsequenz von *Thioalkalivibrio sulfidiphilus* wurden ebenfalls Gene gefunden, welche für ein Thioredoxin und Glutaredoxin kodieren und sich stromabwärts des Rhodanese-Gens befinden. Der Vergleich von Alvin\_3028 mit Proteinsequenzen aus der Familie der Chlorobiaceae (*Chlorobaculum tepidum*, *Chlorobaculum parvum*) ergab nur wenige Übereinstimmungen mit Proteinen,

deren Funktion als Rhodanesen annotiert sind. Hier weichen die Genumgebungen auch von den oben dargestellten Ergebnissen ab.

Tabelle 3.2: **Abgeleitete BLASTp Ergebnisse nach (Altschul et al., 1997) mit Alvin\_3028 als Vergleichssequenz.**

Accession	Beschreibung	Identitäten	E -wert
<b>Chromatiaceae</b>			
EXJ17122.1	Protein mit Rhodanesedomäne [ <i>Thiorhodococcus</i> sp. AK35]	84 %	4e-86
WP_007040882.1	Schwefeltransferase [ <i>Thiorhodococcus drewsi</i> ]	82 %	5e-85
YP_006414831.1	Rhodanese-verwandte Schwefeltransferase [ <i>Thiocystis violascens</i> DSM 198]	78 %	1e-79
WP_007193441.1	Schwefeltransferase [ <i>Thiocapsa marina</i> ]	72 %	2e-75
AHF05288.1	Schwefeltransferase [ <i>Marichromatium purpuratum</i> 984]	73 %	2e-73
WP_020506878.1	Schwefeltransferase [ <i>Lamprocystis purpurea</i> ]	71 %	5e-73
WP_009148668.1	Schwefeltransferase [ <i>Thiorhodovibrio</i> sp. 970]	67 %	1e-68
YP_007245958.1	Rhodaneseverwandte Schwefeltransferase [ <i>Thioflavococcus mobilis</i> 8321]	65 %	2e-65
<b>Ectothiorhodospiraceae</b>			
WP_011813497.1	Protein mit Rhodanesedomäne [ <i>Halorhodospira halophila</i> SL 1]	33 %	2e-21
YP_002515339.1	Protein mit Rhodanesedomäne [ <i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i> HL-EbGr7]	36 %	3e-29
<b>Chlorobiaceae</b>			
WP_010932201.1	Rhodanese [ <i>Chlorobaculum tepidum</i> ]	34 %	2e-12
WP_012502610.1	Rhodanese [ <i>Chlorobaculum parvum</i> ]	31 %	6e-14

### 3.1.2 Analyse der transkriptionellen Regulation von Alvin\_3028

Die Untersuchung zur Regulation von Genen, während der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen im Vergleich zum photoorganoheterotrophen Wachstum, wurde durch die Erstellung eines transkriptionellen Profils von Weissgerber et al. (2013) ermöglicht. Hierfür wurden *Alc. vinosum* Kulturen photoorganoheterotroph (22 mM Malat) oder photolithoautotroph mit 50 mM Schwefel (3 Stunden), 4 mM Sulfid (1 Stunde) und 10 mM Thiosulfat (2 Stunden) angezogen (Ausubel et al., 1997). Es folgte die Extraktion der RNA, welche in cDNA umgeschrieben wurde. Microarray Experimente folgten, mit denen Gene identifiziert wurden, deren mRNA Level bei der Oxidation von Schwefelverbindungen erhöht vorlagen (Weissgerber et al., 2013). In diesem Zuge konnten die relativen mRNA Level des Gens Alvin\_3028 untersucht werden, die unabhängig der Wachstumsbedingungen konstant blieben (**Tabelle 3.3**).

In einer weiteren Versuchsreihe sollten diese Daten mittels qRT-PCR verifiziert und erweitert werden. Dafür wurden *Alc. vinosum* Kulturen in drei unterschiedlichen Ansätzen photolithoautotroph (4 mM Thiosulfat, 4 mM Sulfid, 50 mM Schwefel) angezogen. Um dynamische Änderungen der Transkriptbildung im Verlauf der Schwefeloxidationen zu erkennen, wurden Zellen zu unterschiedlichen Zeiten geerntet. Es wurden Zeitpunkte während der Bildung sowie des Abbaus von Schwefelkugeln gewählt. Außerdem wurde eine Kultur mit Malat angezogen, deren Zellen zu vergleichbaren

Tabelle 3.3: Relative mRNA Level für Alvin\_3028 aus Microarray-Analysen.

Schwefelquelle:	Zellernte nach:	Relative mRNA Änderung [Microarray]*
		Alvin_3028
4 mM Sulfid	2 Std.	0,7
10 mM Thiosulfat	1 Std.	0,9
50 mM Schwefel	3 Std.	0,5

Relative mRNA Level während des Wachstums mit 4 mM Thiosulfat, 4 mM Sulfid bzw. 50 mM Schwefel verglichen zum photoorganoheterotrophen Wachstum mit Malat. \* (Weissgerber et al., 2013)

Zeitpunkten geerntet wurden. Dadurch sollten die relativen mRNA Level zwischen photoorganoheterotrophen und photolithoautotrophen Wachstum verglichen werden.

Aus den geernteten Zellen wurde die RNA isoliert und 100 ng für die qRT-PCR eingesetzt. Mit dem QuantiTect SYBR green RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) konnte eine Umschreibung der RNA zu cDNA und eine darauffolgende qRT-PCR gewährleistet werden. Dafür wurden spezifische Primer für Alvin\_3028 und Alvin\_0486 verwendet. Alvin\_0486 kodiert für eine Uroporphyrinogen Decarboxylase (Uro-D) und diente somit als „Housekeeping“-Gen, weil die Transkriptionsrate während der Microarray Experimente immer auf einem gleichbleibenden Level vorzufinden war (Weissgerber et al., 2013).

Auch bei diesen Versuchen blieben die mRNA Level für Alvin\_3028 bei der Oxidation von Thiosulfat und Sulfid konstant niedrig. Bei der Oxidation von Schwefel zeigten sich allerdings nach 24 Stunden erhöhte Werte. Das Gen Alvin\_3028 wird folglich nur in Anwesenheit von Schwefel in einem erhöhten Maße transkribiert und auch erst im späteren Oxidationsverlauf, wenn der Schwefelkugelabbau erfolgt (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Relative mRNA Level für Alvin\_3028 aus qRT-PCR-Analysen.

Locus tag / Gen	Relative mRNA Änderung [qRT-PCR]											
	4 mM Thiosulfat				4 mM Sulfid				50 mM Schwefel			
	1 h	4 h	8,5 h	10,5 h	1 h	3 h	5 h	8 h	2 h	3 h	8 h	24 h
<b>Alvin_3028</b>	-1,6	-1,7	-1,2	-1,3	-1,8	-2,3	-2,0	-1,1	-1,2	-1,7	<b>1,5</b>	<b>2,1</b>

Die Zellen wurden photolithoautotroph mit 4 mM Sulfid, 4 mM Thiosulfat und 50 mM Schwefel angezogen. Relative mRNA Level wurden mit mRNA Level verglichen, die während photoorganoheterotrophen Wachstum erhalten wurden. Die Kalibrierung wurde mittels Alvin\_0486 (Uroporphyrinogen Decarboxylase D), dem „Housekeeping“-Gen, erstellt. Die Zeitpunkte geben die Erntezeiten an.

### 3.1.3 Klonierung, heterologe Produktion und Aufreinigung des rekombinanten Alvin\_3028

Das Gen Alvin\_3028 wurde in den Überexpressionsvektor pET22b(+) über *Nde*I- und *Hind*III-Restriktionsstellen kloniert. Das resultierende Plasmid pet22-3028 (**Abb. 3.3 A**) enthielt somit keinen pelB-Leader, wodurch ein Transport des gebildeten Proteins ins Periplasma verhindert werden konnte. Der Vektor ermöglichte weiterhin eine Fusionierung des Proteins an einem C-terminalen Oligo-Histidin-Tag (His-Tag). Das konstruierte Plasmid pet22-3028 wurde in *E. coli* C41 transformiert, da dieser Stamm besonders für die Produktion von Membranproteinen geeignet ist (Miroux and Walker, 1996).

Nach heterologer Überexpression von Alvin\_3028 in *E. coli* C41 wurden die Zellen abgeerntet, lysiert und das Lysat (Überstand nach Zentrifugation) für zwei Stunden einer Ultrazentrifugation (45.000 rpm) unterzogen, um die Membranfraktion von der löslichen Fraktion zu trennen. Beide Fraktionen wurden mittels SDS-Page und anschließendem Immunoblot (Antikörper spezifisch gegen His-Tag) überprüft. Hierbei konnte bestätigt werden, dass sich das Protein nur in der Membranfraktion befand und Alvin\_3028 somit ein membrangebundenes Protein ist (**Abb. 3.3 B**).

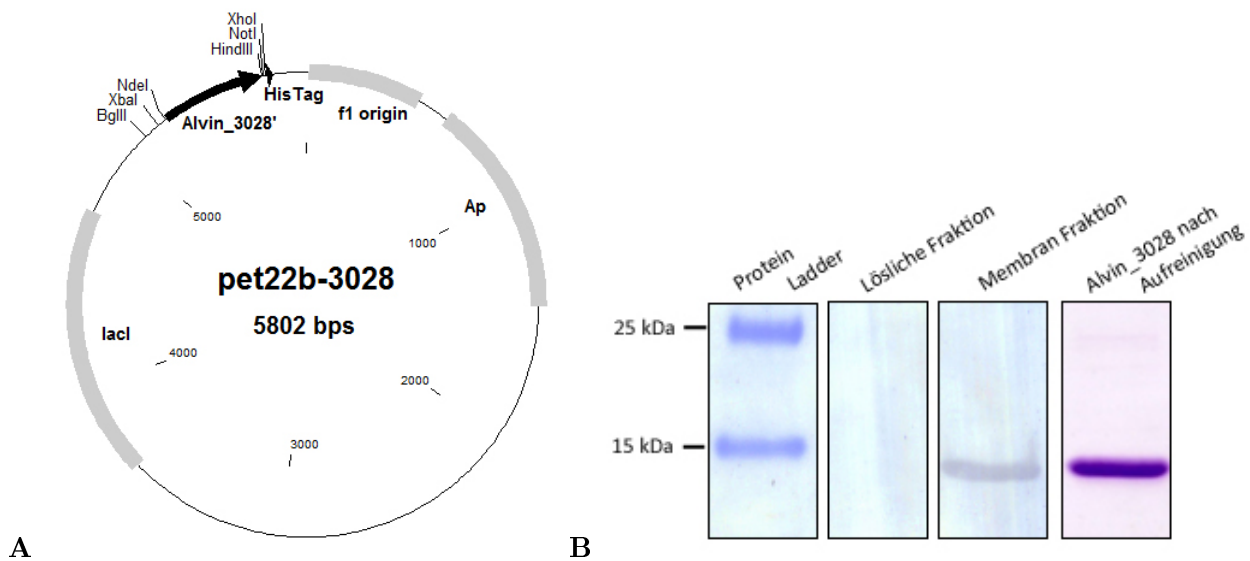


Abbildung 3.3: **Das konstruierte Überexpressionsplasmid pet22b-3028 (A), die Immunoblot Analyse der löslichen- und der Membranfraktion sowie eine SDS-Page Analyse des aufgereinigten Alvin\_3028 (B).** Die Immunoblot Analyse wurde mit verdünnten Membranfraktionen (1:50) und verdünnter, löslicher Fraktion (1:5) durchgeführt. Auf die SDS-Page (15%-iges Tricin Gel) wurde 2 µg aufgereinigtes und entsalztes Alvin\_3028 geladen.

Die Membran wurde anschließend mit 1% Triton X-100 solubilisiert und die Membranproteine konnten in einem zusätzlichem Ultrazentrifugationsschritt extrahiert werden. Die Isolierung von Alvin\_3028 erfolgte über eine nachfolgende Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie. Hier wurde jedem eingesetzten Puffer und dem Lagerungspuffer (50 mM TrisHCl, pH 7,5) 0,1 % Triton X-100 zugesetzt. Nach allen Aufreinigungsschritten erhielt man eine Proteinkonzentration von 0,12 µg/µL, welche nach einer Aceton-Fällungsmethode ermittelt werden konnte. Diese war notwendig, da Triton X-100 mit BCA bzw. Bradford reagieren kann und somit für die Konzentrationsbestimmung entfernt



werden musste.

Eine anschließende SDS-Page zeigte eine einzelne Bande mit einer ungefähren Größe von 15 kDa. Dieses Ergebnis stimmt mit der errechneten Molekularmasse von 15,5 kDa (Alvin\_3028HisTag) überein (**Abb. 3.3 B**). Trotz des Zusatzes von Triton X-100 im Lagerungspuffer, destabilisierte sich Alvin\_3028 beim Einfrieren (-70 °C) und auch die Verwendung eines anderen Puffers (0,1 M KPP Puffer; pH 6) oder der Zusatz von Glycerin konnte diesen Effekt nicht verhindern. Deswegen wurde das rekombinante Alvin\_3028 auf Eis gelagert und die anschließenden Rhodanese-Assays zügig nach Aufreinigung durchgeführt, um einem möglichen Aktivitätsverlust entgegen zu wirken.

### 3.1.4 Untersuchung der Schwefeltransferase-Aktivität von Alvin\_3028

Die heterologe Expression und die anschließende Aufreinigung des rekombinanten Alvin\_3028 ermöglichte eine Analyse der enzymatischen Eigenschaften des membrangebundenen Proteins. Beim TST-Assay zeigte Alvin\_3028 eine charakteristische Rhodanese-Aktivität von 15 U/mg, welche durch pH-Wert Anpassung weiter gesteigert werden konnte. Bei einem pH von 9,5 wurde eine Aktivität von 52 U/mg erreicht (**Tabelle 3.5**).

Basierend auf dem gleichen Assay wurde statt Thiosulfat, Glutathionpersulfid als Substrat verwendet. Hier wurden nur sehr geringe Aktivitäten und auch nur im alkalischen Milieu erhalten (2 U/mg). Im Gegensatz dazu, katalysiert Alvin\_3028 den Schwefeltransfer von Polysulfiden zu Cyanid mit einer höheren Aktivität von 400 U/mg. Dieser Assay wurde unter anaeroben Bedingungen und nach der Beschreibung von Klimmek et al. (1998) durchgeführt. Genaue kinetische Bestimmungen waren aufgrund der Instabilität des Proteins nicht durchführbar. Trotzdem konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass Alvin\_3028 in der Lage ist, den Schwefeltransfer zu katalysieren und neben Thiosulfat auch andere Substrate für diesen verwendet.

Tabelle 3.5: **Spezifische Aktivitäten (U/mg) von Alvin\_3028 mit unterschiedlichen Substraten.**

Substrat	Spezifische Aktivität [U/mg]
Thiosulfat <sup>1</sup>	52
Glutathionpersulfid <sup>2</sup>	2
Polysulfide <sup>3</sup>	400

<sup>1</sup>0,5 M Glycin Puffer (pH 9,5); 50 mM Thiosulfat; 50 mM CN<sup>-</sup>

<sup>2</sup>0,5 M Glycin Puffer (pH 9,5); 250 mM Glutathionpersulfid; 50 mM CN<sup>-</sup>

<sup>3</sup>50 mM TrisHCl (pH 8,3); 2,3 mM Polysulfide; 10 mM CN<sup>-</sup>

### 3.1.5 Die zelluläre Orientierung des C-Terminus

Alvin\_3028 ist über eine einzelne N-terminale Helix an der Membran gebunden. Die Rhodanese-Domäne, welche das katalytische Cystein enthält, ist am C-Terminus positioniert. Um untersuchen zu können, bei welchen physiologischen Mechanismen Alvin\_3028 genau beteiligt sein könnte, sollte die zelluläre Position des C-Terminus bekannt sein. Hierfür wurden Reportergene (*phoA*, *uidA*) translational an Alvin\_3028 fusioniert, welche für eine Alkalische Phosphatase bzw. für eine Glucuronidase kodieren. Nach heterologer Expression von Alvin\_3028, gebunden an das jeweilige Re-

porterprotein, wurden charakteristische Enzymassays durchgeführt. Da die Alkalische Phosphatase nur im Periplasma aktiv ist, wohingegen die Glucuronidase nur im Cytoplasma ihre Funktionalität aufzeigt, sollte somit die Position des C-Terminus von Alvin\_3028 bestimmt werden.

### 3.1.5.1 Konstruktion der „Reporterfusions-Plasmide“

Für die Amplifizierung des Gens *phoA* diente als Template das Plasmid psWFII (Ehrmann et al., 1990).

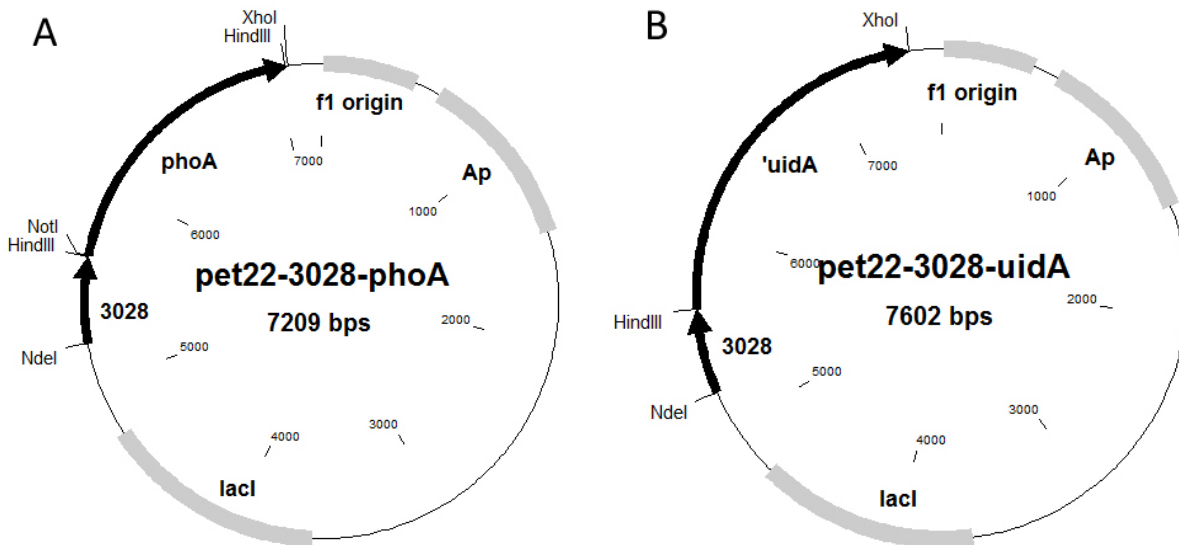


Abbildung 3.4: Plasmidkarten von pet22-3028-*phoA* (A) und pet22-3028-*uidA* (B).

Mit verlängerten Primern, welche die Restriktionsschnittstellen für *NotI* und *XhoI* besaßen, konnte das Amplifikat in den zuvor konstruierten Überexpressionsvektor pet22-3028 kloniert werden. Für die Klonierung von *uidA* wurde das Plasmid pBBR1p264 (Kallnik et al., 2010) als Template verwendet. Das Amplifikat wurde über die hinzugefügten Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *XhoI* ebenfalls in das Plasmid pet22-3028 inseriert. Die Gene *phoA* bzw. *uidA* befanden sich *in frame* stromabwärts von Alvin\_3028 (Abb. 3.4).

Weitere Plasmide wurden als Kontrollen konstruiert. Hier sollten die Reporterproteine entweder direkt (ohne Alvin\_3028) im Cytoplasma gebildet oder über einen *pelB*-Leader ins Periplasma transportiert werden. Mögliche Hintergrundreaktionen der Reporterproteine konnten somit überprüft und für die Experimente mit den Fusionsproteinen bewertet werden. Die Tabelle 3.6 zeigt eine Übersicht der konstruierten Kontroll-Plasmide. Alle konstruierten Plasmide wurden anschließend in *E. coli* C41 transformiert.

Tabelle 3.6: Übersicht der konstruierten Kontroll-Plasmide.

Plasmid	pelB leader	Ort des Reporter Proteins	Status des Reporter Proteins
pet22b-phoA	vorhanden	Periplasma	aktiv
pet22-phoA	nicht vorhanden	Cytoplasma	inaktiv
pet22-uidA	nicht vorhanden	Cytoplasma	aktiv
pet22b-uidA	vorhanden	Periplasma	inaktiv

### 3.1.5.2 Alkalische Phosphatase- und Glucuronidase-Aktivitäten der Fusionsproteine und Kontrollen

Die Aktivitäten der Alkalischen Phosphatase (AP) und der Glucuronidase wurden mit ganzen Zellen durchgeführt. Für den Assay wurden je 20 mL-Kulturen mit *E. coli* Vorkulturen 2 %ig angeimpft und der Wachstumsverlauf bei 37 °C verfolgt, indem zu bestimmten Zeitpunkten die Absorption bei 600 nm gemessen wurde (**Abb. 3.5**). Bei einer OD von 0,3-0,4 wurde die Genexpression mit 0,5 mM IPTG induziert und dieser Zeitpunkt als  $t_0$  festgelegt. Für die Assays wurden 100  $\mu$ L entnommen, welche direkt im Anschluss durchgeführt wurden. Weitere Proben wurden nach 30, 60, 90 und 120 Minuten ( $t_{30}$ ,  $t_{60}$ ,  $t_{90}$ ,  $t_{120}$ ) entnommen.

Die Durchführung des AP-Assay erfolgte wie in Bessey et al. (1946) beschrieben. Als Substrat diente p-NPP, welches bei Vorhandensein einer aktiven AP und einem pH von 8,4, hydrolytisch gespalten wird. Das Produkt p-NP ist ein gelber Stoff, der spektrometrisch bei 405 nm nachgewiesen und quantifiziert werden kann. Der Glucuronidase Assay wurde mit dem Substrat pNPG nach Aich et al. (2001) durchgeführt. Alle berechneten Aktivitäten wurde als Miller Units angegeben (**Abb. 3.6**).

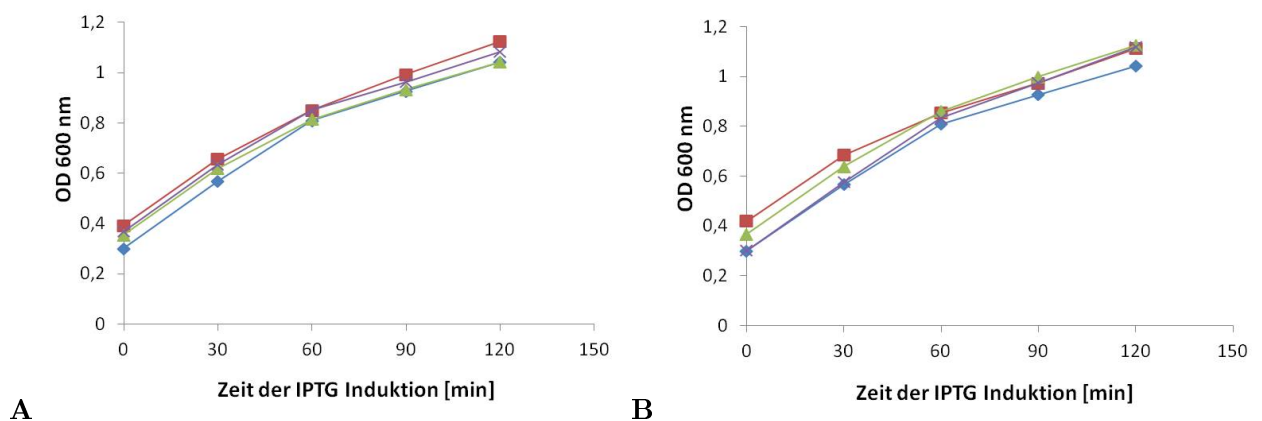


Abbildung 3.5: **Wachstumsverlauf der *E. coli* C41 Kulturen, welche für die Alkalische Phosphatase (A) und Glucuronidase Aktivitäten (B) verwendet wurden.** Die Genexpression wurde mit 0,5 mM IPTG induziert ( $t_0$ ). **A** Die Alkalischen Phosphatase Assays wurden mit *E. coli* C41 Kulturen durchgeführt, die folgende Plasmide beinhaltenen: pet22-3028 ( $\blacklozenge$ , blau), pet22-phoA ( $\blacksquare$ , rot), pet22b-phoA ( $\blacktriangle$ , grün), pet22-3028-phoA ( $\times$ , violett). **B** Glucuronidase Assays wurden mit *E. coli* C41 Kulturen durchgeführt, die folgende Plasmide beinhaltenen: pet22-3028 ( $\blacklozenge$ , blau), pet22b-uidA ( $\blacksquare$ , rot), pet22-uidA ( $\blacktriangle$ , grün), pet22-3028-uidA ( $\times$ , violett).

Als Positivkontrollen wurden die *E. coli* Kulturen verwendet, welche die Plasmide pet22b-phoA und pet22-uidA besaßen. Mit diesen Kulturen wurden die höchsten Aktivitäten gemessen (1175 bzw. 2409 Miller Units), wodurch man annehmen kann, dass die AP im Periplasma und die Glucuronidase im Cytoplasma lokalisiert vorlagen (**Abb. 3.6**; grüne Linien).

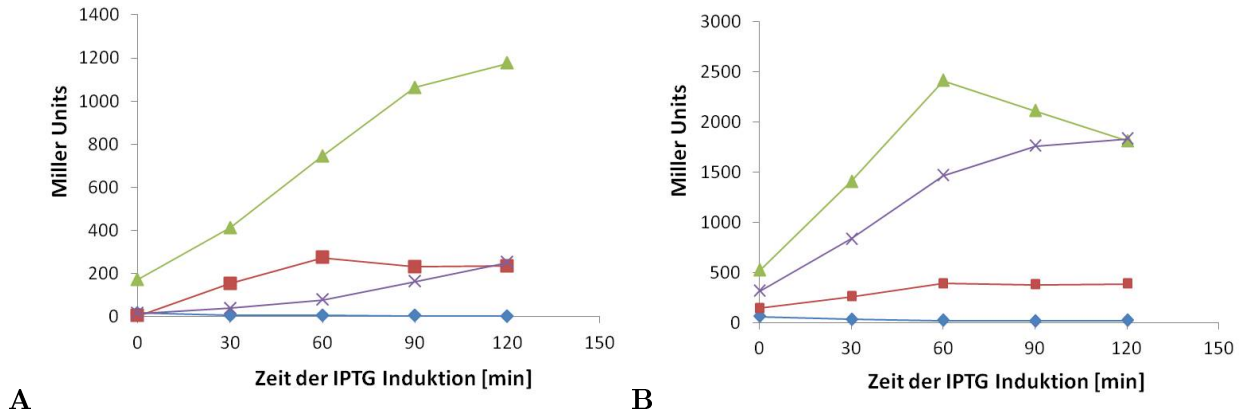


Abbildung 3.6: **Erhaltene Miller Units beim AP-Assay (A) und Glucuronidase-Assay (B).** Die Induktion mit 0,5 mM IPTG wurde als  $t_0$  festgelegt. **A** Die Assays wurden mit *E. coli* C41 Kulturen durchgeführt, die folgende Plasmide enthielten: pet22-3028 (◆, blau), pet22-phoA (■, rot), pet22b-phoA (▲, grün), pet22-3028-phoA (×, violett). **B** *E. coli* C41 Kulturen mit den Plasmiden pet22-3028 (◆, blau), pet22-uidA (■, rot), pet22b-uidA (▲, grün), pet22-3028-uidA (×, violett) wurden für die Glucuronidase-Assays verwendet.

Beide Reporterproteine zeigten eine leichte Hintergrundreaktion (234 bzw. 386 Miller Units) bei einer Lokalisierung im Kompartiment, wo eine vollständige Faltung der jeweiligen Proteine nicht gewährleistet sein sollte (**Abb. 3.6**; rote Linien). Die AP-Aktivität blieb ebenfalls gering, wenn diese an Alvin\_3028 fusioniert vorlag (250 Miller Units). Im Gegensatz dazu zeigte sich eine hohe Glucuronidase-Aktivität (1831 Miller Units) mit fusioniertem Alvin\_3028 (**Abb. 3.6**; violette Linien). Diese Ergebnisse zeigen, dass der C-Terminus von Alvin\_3028, welche die Rhodanese-Domäne enthält, im Cytoplasma lokalisiert ist.

Da sich diese Arbeit mit periplasmatischen Schwefeltransferasen beschäftigte, wurden zur genauen Funktion von Alvin\_3028 keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. Trotzdem wurde versucht eine *in frame*-Mutante *Alc. vinosum*  $\Delta 3028$  herzustellen, was im Laufe dieser Arbeit erfolglos blieb. Das Gen alternativ mittels Streptomycin-Kassette zu unterbrechen war ebenfalls nicht möglich, was auf die Relevanz dieses Proteins für *Alc. vinosum* hindeutet.

## 3.2 Untersuchungen zur putativen Schwefeltransferase Alvin\_0258

Die Aminosäuresequenz der putativen Schwefeltransferase Alvin\_0258 wurden mittels bioinformatischen Programmen näher untersucht. Experimentell wurde eine mögliche Regulation des Gens während der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen mittels qRT-PCR analysiert. Um die enzymatischen Funktionen der Rhodanese untersuchen zu können, wurde das Protein mit einem His-Tag translational fusioniert, heterolog in *E. coli* überproduziert und mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Es folgten Enzymassays mit unterschiedlichen Substraten,

wobei der genaue enzymatische Mechanismus näher beleuchtet wurde und das Protein vollständig charakterisiert werden konnte.

### 3.2.1 Bioinformatische Analysen zu Alvin\_0258

Das Alvin\_0258-Gen kodiert für ein Protein mit einer Rhodanese-Domäne (hier: CRTGNR), welches löslich zu sein scheint, da keine Sequenzabfolge für eine Transmembran-Helix gefunden werden konnte. Die Proteinsequenz enthält eine potentielle Schnittstelle zwischen den Aminosäuren 25 und 26 (AQA-GG), was auf einen Transport ins Periplasma hindeutet. Zusätzliche Cysteine wurden an den Positionen 141 und 144 identifiziert, welche somit ein CXXC Motiv bilden.

Vergleiche von Alvin\_0258 mit Proteinsequenzen aus der Familie der Chromatiaceae (*Thiocystis violascens* und *Thiocapsa marina*) ergaben Identitäten bis zu 50 % (Tabelle 3.7). Hierbei fiel auf, dass auch das CXXC Motiv stark konserviert vorlag (Abb. 3.7) und Signalpeptide für einen Transport ins Periplasma vorhanden sind. Der Vergleich von Alvin\_0258 mit Proteinsequenzen aus der Familie der Ectothiorhodospiraceae und Chlorobiaceae erzielte geringe Ähnlichkeiten von ungefähr 30 %.

Rhd_Tvi	MIKMYNPLRQFATLLGAAFLIGCS--QAAGPTLTAPEALEKAQAAELTLIDIRTPMEWR
Rhd_Thid	MIKLYRSIPSLATILGVALLVIGCS--QAAGPQLSPPEALDMTNKGELTLIDVRTPMEWR
Rhd_Tmb	MKKRVFFYFASAMLLTASLLLASCGGTASSGPELSAPEALEMAERGELTIVDVRTPGEWR
Rhd_Alv	--MPYQSVRRFVALIVASLVFVAGA--QAAGLDLSPQEALAKAKAGEILLIDIRTPPEWR
Rhd_Thim	-MSVLRVSRHNTVVVLAALSLIGCV--QAADATLTATEAMEKARAGEITFIDIRTPPEWR
	. :: ::: . . . . . *:. **: :. *. :::*** **
Rhd_Tvi	QTGVAPLALRIDMQDPKPEGFADKVLAAVRGDKSAPIAII CRTGNRTGYMQRELMARGF
Rhd_Thid	QTGVAPMAHRIDMHNPKGPDGFAQAVLQTVDGDERSAPIGLI CRTGNRSRHMQQELISRGF
Rhd_Tmb	RTGVGAGALEINMIQSRGPDEFVEKLLKTDGDKDAPLALI CRTGNRSGHMQRVLMERGF
Rhd_Alv	ETGVAPEAHRIDMTDP---KFLERLLQDMGGDKSAPIALI CRTGNRSGYVQKQLQKMGF
Rhd_Thim	QTGVAEGALTIDMTAP---TFVQDVLKAVDGDNRNAPIVLI CRTGNRTGYTRDALEKLG
	.***. * *: * . * : : * **: :*: :***** : : : * **
Rhd_Tvi	SNVYNISEGMAGSTAGPGWIRRGLPIESCRNC
Rhd_Thid	THVYDVKEGMMGNSNGPGWVRLGLPVKPCPDC
Rhd_Tmb	THVYNISEGMAGSDAGPGWLERGLPVEDCSSC
Rhd_Alv	SQVHNVPEGMAGSRSGPGWIRRGLPVETCTNC
Rhd_Thim	TNVSHVAEGMAGSKAGPGWVRRGLPVESCKTC
	::* .: *** *. *****: ***: * *

Abbildung 3.7: **Sequenzvergleiche von periplasmatischen Rhodanesen aus verschiedenen schwefeloxidierenden Bakterien, welche zu der Familie der Chromatiaceae gehören.** Sequenzvergleiche wurden mit ClustalW erzeugt (Chenna et al., 2003). Rhd: Rhodanese; Tvi: *Thiocystis violascens*; Thid: *Thiorhodococcus drewsii*; Tmb: *Thioflaviccoccus mobilis*; Alv: *Allochromatium vinosum*; Thim: *Thiocapsa marina*; (\* - Stern): konservierte Reste; (: - Doppelpunkt): Konservierung zwischen Aminosäuren mit sehr ähnlichen Eigenschaften; (. - Punkt): Konservierung zwischen Aminosäuren mit weniger ähnlichen Eigenschaften. Die Rhodanese-Domäne ist mit rot hervorgehoben, wohingegen zusätzliche Cysteine mit blau unterlegt sind. Schnittstellen sind mit einem roten Strich gekennzeichnet.

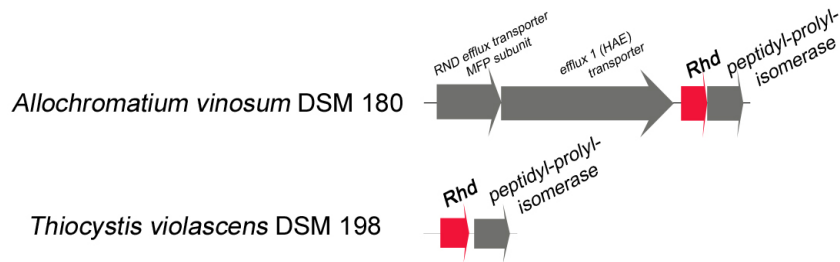


Abbildung 3.8: **Genregion-Analyse von Alvin\_0258 und Thivi\_2722.** Rhd: Protein mit Rhodanese-Domäne (rot). Abgeleitete Abbildungen wurden mittels "Genome map" Tool von "KEGG" hergestellt. Analyzierte Genregionen von *Allochromatium vinosum* DSM 180: Alvin\_0256-Alvin\_0259 und *Thiocystis violascens* DSM 198: Thivi\_2721-Thivi\_2722.

In der Genumgebung von Alvin\_0258 wurde stromaufwärts ein Gen identifiziert, das für einen Efflux Transporter kodiert. Ähnliche Gene wurden in den Genumgebungen der Proteine aus Chromatiaceae, Ectothiorhodospiraceae und Chlorobiaceae nicht gefunden. Stromabwärts von Alvin\_0258 liegt ein Gen, welches als Peptidyl-Prolyl-Isomerase annotiert ist. Ein ähnliches Gen (Thivi\_2722) konnte nur bei *Thiocystis violascens* gefunden werden (Abb. 3.8).

Tabelle 3.7: **Abgeleitete BLASTp Ergebnisse mit Alvin\_0258 als Vergleichssequenz.**

Accession	Beschreibung	Identitäten	E Wert
<b>Chromatiaceae</b>			
WP_014779073.1	Schwefeltransferase [ <i>Thiocystis violascens</i> ]	58 %	1e-54
WP_007194606.1	Schwefeltransferase [ <i>Thiocapsa marina</i> ]	54 %	7e-51
WP_007039364.1	Schwefeltransferase [ <i>Thiorhodococcus drewsii</i> ]	51 %	2e-46
WP_020504428.1	Hypothetisches Protein [ <i>Lamprocystis purpurea</i> ]	50 %	1e-41
WP_015280834.1	Rhodanese-ähnliche Schwefeltransferase [ <i>Thioflavococcus mobilis</i> ]	53 %	4e-40
<b>Ectothiorhodospiraceae</b>			
WP_011813168.1	Hypothetisches Protein [ <i>Halorhodospira halophila</i> ]	35 %	1e-10
WP_012638519.1	Schwefeltransferase [ <i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i> ]	35 %	2e-10
<b>Chlorobiaceae</b>			
WP_010932201.1	Rhodanese [ <i>Chlorobaculum tepidum</i> ]	37 %	1e-04
WP_012501620.1	Schwefeltransferase [ <i>Chlorobaculum parvum</i> ]	32 %	9e-12

### 3.2.2 Analyse der transkriptionellen Regulation von Alvin\_0258

Wie bereits zu Alvin\_3028, wurden auch zu Alvin\_0258 die Microarray-Ergebnisse von Weissgerber et al. (2013) mit den Ergebnissen der qRT-PCR-Daten aus dieser Arbeit verglichen. Bei den Microarray-Assays zeigte sich nur ein erhöhter mRNA-Level während des Wachstums auf Schwefel (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Relative mRNA Level für Alvin\_0258 aus Microarray-Analysen.

Schwefelquelle:	Zellernte nach:	Relative mRNA Änderung [Microarray]*
		Alvin_0258
4 mM Sulfid	2 Std.	0,7
10 mM Thiosulfat	1 Std.	0,5
50 mM Schwefel	3 Std.	1,9

Relative mRNA Level während des Wachstums mit 4 mM Thiosulfat, 4 mM Sulfid bzw. 50 mM Schwefel verglichen zum photoorganoheterotrophen Wachstum mit Malat. \* (Weissgerber et al., 2013)

Bei den qRT-PCR-Analysen zeigte sich wiederum, dass der Zeitraum der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen für die Regulierung vom Alvin\_0258-Gen entscheidend ist. Beim Wachstum mit 4 mM Thiosulfat war der relative mRNA Level für Alvin\_0258 nach einer Stunde erhöht, wohingegen dieser nach vier Stunden bereits deutlich gesunken war (Abb. 3.9 A).

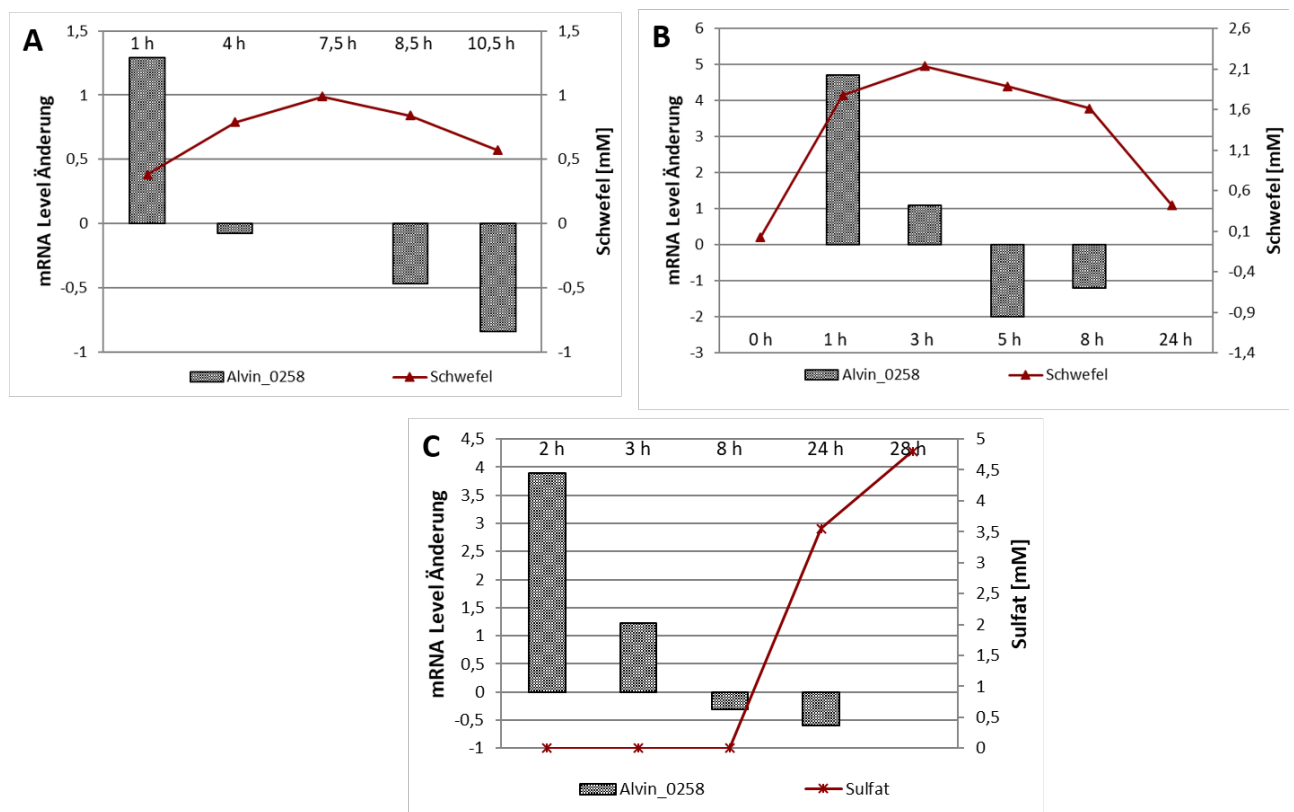


Abbildung 3.9: Relative mRNA Level von Alvin\_0258 während der Oxidation von 4 mM Thiosulfat (A), 4 mM Sulfid (B) bzw. 50 mM Schwefel (C) verglichen mit den resultierenden mRNA Level beim photoorganoheterotrophen Wachstum. Die Kalibrierung wurde mittels Alvin\_0486 (Uroporphyrinogen Decarboxylase D), dem „Housekeeping“-Gen, erstellt. Die Zeitpunkte (h) geben die Erntezeiten an. Schwefelkugelauf- und -abbau wurden mittels Schwefel- bzw. Sulfatkonzentrationen bestimmt.

Beim Wachstum mit 4 mM Sulfid war nach einer Stunde die Erhöhung des mRNA Levels deutlich stärker ausgeprägt, als bei den Microarray-Assays. Bei Letzteren wurde erst nach zwei Stunden geerntet und auch bei der qRT-PCR wurde ersichtlich, dass der mRNA Level stark abnimmt, je weiter die Oxidation fortschreitet. Der intrazelluläre Schwefelgehalt betrug zum Zeitpunkt des erhöhten mRNA Levels bereits 1,8 mM (**Abb. 3.9 B**), sodass die mRNA Level-Erhöhung zum Zeitpunkt des Schwefelkugelaufbaus erfolgte.

Auch beim Wachstum mit 50 mM Schwefel wurde diese Tendenz ersichtlich. Während der frühen Phase der Oxidation war der mRNA Level erhöht und nahm im späteren Verlauf ab (**Abb. 3.9 C**). Da während der Schwefeloxidation nicht zwischen intra- und extrazellulärem Schwefel unterschieden werden kann, wurde die Sulfatkonzentration bestimmt, um den Fortschritt der Oxidation nachzuvollziehen. Zu Beginn der Oxidation von Schwefel werden Schwefelkugeln aufgebaut, womit die Sulfatkonzentration folglich gering bleibt. Zu diesen Zeitpunkten waren die mRNA Level erhöht. Wird der Schwefel aus den Schwefelkugeln mobilisiert, um im Cytoplasma weiter zu Sulfat oxidiert zu werden, nimmt ebenfalls die Menge an intrazellulären Schwefelkugeln ab. Zu diesem Zeitpunkt war der mRNA Level ebenfalls im negativen Bereich. Die genauen Werte sind in **Tabelle 3.9** zusammengefasst.

Tabelle 3.9: **Relative mRNA Level für Alvin\_0258 aus qRT-PCR-Analysen.**

Locus tag / Gen	Relative mRNA Änderung [qRT-PCR]											
	4 mM Thiosulfat				4 mM Sulfid				50 mM Schwefel			
	1 h	4 h	8,5 h	10,5 h	1 h	3 h	5 h	8 h	2 h	3 h	8 h	24 h
<b>Alvin_0258</b>	<b>1,3</b>	- 0,1	-0,5	- 0,8	<b>4,7</b>	1,1	- 2,0	- 1,2	<b>3,9</b>	1,2	- 0,3	- 0,6

Die Zellen wurden photolithoautotroph mit 4 mM Sulfid, 4 mM Thiosulfat und 50 mM Schwefel angezogen. Relative mRNA Level wurden mit mRNA Level verglichen, die während photoorganoheterotrophen Wachstum erhalten wurden. Die Kalibrierung wurde mittels Alvin\_0486 (Uroporphyrinogen Decarboxylase D), dem „Housekeeping“-Gen, erstellt. Die Zeitpunkte geben die Erntezeiten an.

Während der Oxidation von Thiosulfat, Sulfid oder Schwefel konnte eine deutliche Variabilität der Transkriptmenge für das Alvin\_0258-Gen gezeigt werden. Die relativen mRNA Level waren während der Schwefelkugelbildung erhöht, wohingegen sie beim Schwefelkugelabbau stark erniedrigt vorlagen. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Werten aus den Microarray-Experimenten, wobei hier verdeutlicht werden konnte, dass eine erhöhte Transkriptmenge nur zu Beginn der Oxidation von Schwefelverbindungen vorliegt, die aus den Microarray-Assays nicht ersichtlich war. Die leichten Unterschiede können mit den Anzuchtbedingungen erklärt werden, da in diesen Versuchen temperierte Glasfermenter verwendet wurden, wohingegen die *Alc. vinosum* Kulturen für die Microarray-Experimente in Kulturflaschen angezogen wurden.



### 3.2.3 Klonierung, heterologe Produktion und Aufreinigung des rekombinanten Alvin\_0258

Der zuvor konstruierte Überexpressionsvektor pet22-Alvin0258 (Katja Kirsch; persönliche Mitteilung) wurde in *E. coli* BL21 transformiert. Nach heterologer Überexpression von Alvin\_0258 wurden die Zellen abgeerntet, lysiert und das Protein mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die einzelnen Aufreinigungsfractionen wurden mittels SDS-Page überprüft. Die Fractionen, welche die höchste Reinheit des Proteins aufwiesen, wurden vereinigt. Ein Pufferwechsel (50 mM TrisHCl-Puffer; pH 7,5) wurde durchgeführt, um das eventuell schädliche Imidazol zu entfernen. Das Protein zeigte eine hohe Stabilität und konnte in Schwefeltransferase-Assays eingesetzt werden (**Abb. 3.10**).

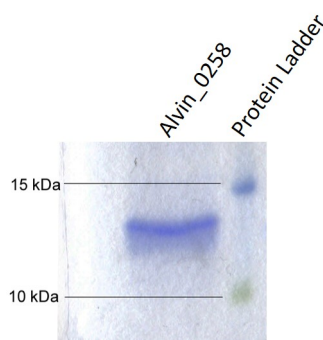


Abbildung 3.10: **SDS-Page Analyse des aufgereinigten Alvin\_0258**. Nach dem Pufferwechsel (50 mM TrisHCl; pH 7,5) wurden 20  $\mu$ L aufgereinigtes Alvin\_0258 auf eine 15%ige SDS-Page gegeben.

### 3.2.4 Schwefeltransferase-Aktivität von Alvin\_0258

Die generelle Fähigkeit von Alvin\_0258, Schwefel von einem Donor zu einem Akzeptor zu transferieren, sollte mit dem Rhodanese-Assay nachgewiesen werden. Hierbei wurde untersucht, ob die potentielle Rhodanese ein Schwefelatom von Thiosulfat an die Thiolgruppe des katalytischen Cysteins binden kann. In einem weiteren Schritt gibt die Rhodanese das Schwefelatom an Cyanid weiter, wodurch Thiocyanat entsteht und die Thiolgruppe des Proteins für eine neue Reaktion frei wird. Das aufgereinigte, rekombinante Alvin\_0258 zeigte die beschriebene Aktivität und wird im folgenden näher charakterisiert.

Eine Aktivitätssteigerung ließ sich bei einer Proteinmenge von 0,05-0,10  $\mu$ g in einem alkalischen Milieu erzielen (840 U/mg). Mit unterschiedlichen Puffersystemen konnte eine konstante Aktivität im pH-Bereich von 8,5-10 gemessen werden (**Abb. 3.11 A**). Mit pH-Werten über 10 und unter 8 zeigten sich dagegen deutliche Aktivitätsverluste. Bei längerer Inkubation der Rhodanese in diesem pH-Bereich und dem entsprechendem Puffersystem wurde die Funktionalität der Rhodanese nicht beeinflusst, da bei anschließenden Rhodanese-Assays keine Aktivitätsverluste auftraten. Die folgenden Versuche wurden daher mit dem 0,5 M Glycinpuffer bei einem pH von 9,5 durchgeführt. Das Temperaturoptimum zeigte sich bei 60 °C, da hier eine weitere Aktivitätssteigerung von 625 U/mg erreicht wurde (**Abb. 3.11 B**). Längere Inkubationszeiten bei 60 °C führten allerdings zu Aktivitätsverlusten. Bei 30 °C blieb das Protein über längere Zeit stabil.

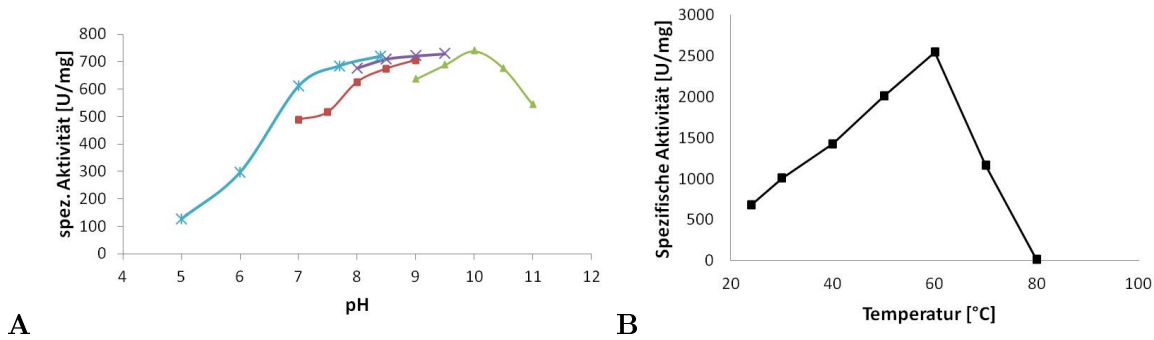


Abbildung 3.11: **Bestimmung des pH- (A) und Temperaturoptimums (B) der Rhodanese Alvin\_0258 im Rhodanosenachweis.** A 0,55  $\mu\text{g}$  Alvin\_0258 und folgende Endkonzentrationen der Puffersysteme wurden verwendet: 50 mM KPP-Puffer (blaue Linie), 50 mM TrisHCl-Puffer (rote Linie), 50 mM Glycin-Puffer (violette Linie), 50 mM CAPS-Puffer (grüne Linie). Die Assays wurden bei 30 °C und mit einer Inkubationszeit von 3 Minuten durchgeführt. B 50 mM Glycin-Puffer (pH 9,5) und 0,55  $\mu\text{g}$  Alvin\_0258 wurden für die Assays verwendet. Die Inkubationszeit betrug hier 1 Minute. Die Endkonzentrationen der Substrate Thiosulfat und Cyanid betrug je 50 mM.

Tabelle 3.10: **Vergleich der Michaelis-Konstanten  $K_M$  bei der Reaktion von Alvin\_0258 mit den Substraten Thiosulfat bzw. Cyanid.**

Substrat	$K_M$ [mM]
Thiosulfat	0,43
Cyanid	50,2

Zur Bestimmung der  $K_M$  Werte wurden die Assays in 50 mM Glycinpuffer (pH 9,5) und mit 0,22  $\mu\text{g}$  Alvin\_0258 durchgeführt. Wenn die Thiosulfatkonzentration variiert wurde, blieb die Cyanidkonzentration bei 50 mM konstant. Wenn die Cyanidkonzentration variiert wurde, blieb die Thiosulfatkonzentration bei 50 mM.

Um die Affinitäten der Rhodanese Alvin\_0258 für Thiosulfat bzw. Cyanid zu bestimmen, wurde im ersten Versuchsansatz die Cyanidkonzentration konstant bei 50 mM gehalten, während die Thiosulfatkonzentration variiert wurde. Hierbei wurde ein  $K_M$  von 0,43 mM für Thiosulfat bestimmt. Im Gegensatz dazu wurde im zweiten Versuchsansatz die Thiosulfatkonzentration bei 50 mM konstant gehalten, während die Cyanidkonzentration variiert wurde. Dabei wurde ein  $K_M$  von 50,2 mM für Cyanid bestimmt (**Tabelle 3.10**). Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Affinität der Rhodanese zu Thiosulfat 100-fach höher als zu Cyanid ist.

Im Gegensatz zu anderen Enzymen katalysieren Rhodanesen die Umsetzung von zwei Substraten (hier: Thiosulfat, Cyanid). Um einen näheren Eindruck über den enzymatischen Verlauf dieser Reaktion zu erhalten, wurden weitere kinetische Daten erhoben. Dabei wurde die Cyanidkonzentration bei 50 mM, 30 mM bzw. 10 mM konstant gehalten, wobei die Thiosulfatkonzentration variiert wurde. Dabei wurde eine Reihe an hyperbolischen Plots erhalten, welche in ein Michaelis-Menten-Diagramm eingefügt wurden (**Abb. 3.12 A**). Wenn man diese Daten in ein Lineweaver-Burk-Plot überführt, sieht man mehrere lineare Verläufe, deren Muster davon abhängig sind, wie die Substrate bzw. Produkte mit dem Enzym interagieren. Erhält man, wie in dieser Reaktion, mehrere parallel

verlaufende Lineweaver-Burk-Plots (**Abb. 3.12 B**), kann man von einem „Ping-Pong“-Mechanismus ausgehen. Übertragen auf diese Rhodanese-Reaktion bedeutet dies, dass zunächst das erste Substrat (Thiosulfat) an das Enzym bindet, wodurch das Produkt (Sulfit) gebildet wird und die Bindungsstelle des Enzyms verlässt. Der Rest des Substrates ist weiterhin kovalent am Enzym gebunden und kann nun mit dem zweiten Substrat (Cyanid) interagieren, wodurch ein weiteres Produkt (Thiocyanat) gebildet wird.

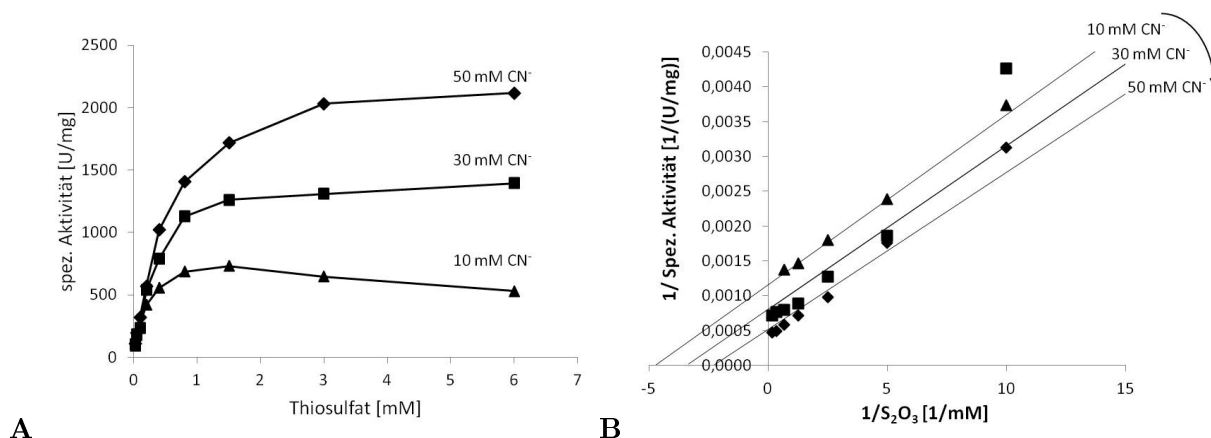


Abbildung 3.12: **Michaelis-Menten- (A) und Lineweaver-Burk-Plots (B) der Enzymkinetik von Alvin\_0258 mit den Substraten Thiosulfat und Cyanid.** Alle Assays wurden mit 500 mM Glycin-Puffer (pH 9,5) und 0,22  $\mu\text{g}$  Alvin\_0258 durchgeführt.

### 3.2.5 Schwefeltransferase-Aktivität mit alternativen Substraten

Im folgenden soll darauf eingegangen werden, dass die Rhodanese Alvin\_0258 nicht nur Thiosulfat als Substrat verwenden kann. Angelehnt an dem Rhodanese-Assay wurde statt Thiosulfat selbst hergestelltes Glutathionpersulfid (GSSH) als Substrat verwendet. Die erhaltenen Aktivitäten waren mit GSSH geringer (297 U/mg) als mit Thiosulfat (1666 U/mg) und wurden ebenfalls nur bei einem alkalischen Milieu (pH 9,5) erhalten. Kinetische Analysen zeigen weiterhin, dass die Affinität zu GSSH geringer ist als zu Thiosulfat, da ein  $K_M$  von 22,2 mM für GSSH erhalten wurde (**Tabelle 3.11**).

Tabelle 3.11: **Vergleich der Schwefeltransferase-Aktivitäten von Alvin\_0258 mit unterschiedlichen Substraten.**

Substrat	Spez. Aktivität [U/mg]	$K_M$ [mM]
Thiosulfat <sup>1</sup>	1666	0,43
Glutathionpersulfid <sup>2</sup>	297	22,2
Polysulfide <sup>3</sup>	6644	0,54

<sup>1</sup>0,5 M Glycinpuffer (pH 9,5); 50 mM Thiosulfat; 50 mM  $\text{CN}^-$

<sup>2</sup>0,5 M Glycinpuffer (pH 9,5); 250 mM GSSH; 50 mM  $\text{CN}^-$

<sup>3</sup>50 mM TrisHCl (pH 8,3); 2,3 mM Polysulfide; 10 mM  $\text{CN}^-$

In einem anderen Assay nach Klimmek et al. (1998) konnte mit Polysulfiden die höchste Aktivität von 6644 U/mg erhalten werden. Die Affinität zu Polysulfiden ist hier mit 0,54 mM generell höher als für GSSH oder Cyanid und vergleichbar mit der Affinität zu Thiosulfat.

### 3.3 Untersuchungen zum Sox-Multienzymkomplex

Trotz eingehender Untersuchungen des Sox-Multienzymkomplexes (Hensen et al., 2006) blieben einige Fragen offen. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Gencluster *soxXAKL* näher untersucht und eine mögliche Co-Transkription von *soxK* und *soxL* nachgewiesen werden. Auch die Rolle von SoxK, dessen Anwesenheit einen stabilen Komplex zwischen SoxX und SoxA ermöglichen sollte, wurde für *Alc. vinosum* noch nicht bestätigt und wurde folglich näher untersucht.

Weiterhin wurde die enzymatische Aktivität des Sox-Multienzymkomplexes untersucht, indem ausschließlich aufgereinigte Proteine aus *Alc. vinosum* verwendet wurden. Die Enzyme SoxB, SoxYZ, SoxL konnten bereits im Vorfeld heterolog produziert und aufgereinigt werden und standen für diese Untersuchungen zur Verfügung (Welte et al., 2009). Die Aufreinigung von SoxXAK wurde im Laufe der Bachelorarbeit von Christina Molitor (2013) modifiziert bis ein stabiler und mit Häm beladener Proteinkomplex erhalten werden konnte.

Der Proteinkomplex SoxYZ stand hierbei im Zentrum der Untersuchungen und es wurde eine strukturelle Umwandlung von SoxYZ erkannt, die sich auf die Aktivität des Proteinkomplexes auswirkt.

#### 3.3.1 Transkriptionelle Analyse des *soxXAKL* Genclusters aus *Alc. vinosum*

In *Alc. vinosum* sind die Gene des Sox-Systems in drei transkriptionelle Einheiten eingeteilt. Die Gene *soxY* und *soxZ* (Alvin\_2111 und Alvin\_2112) bilden ein unabhängiges Gen-Cluster, das im Genom abseits von den anderen Sox-Genen liegt (Hensen et al., 2006). Eine zweite transkriptionelle Einheit enthält die Gene *soxB* und wahrscheinlich Alvin\_2166, welche in umgekehrter Leserichtung des dritten Gen-Clusters liegen. Dieses enthält wiederum die Gene *soxX*, *soxA* und *soxK* (**Abb. 3.13 A**). Stromabwärts dieses Clusters liegen die Gene *soxL* und Alvin\_2172. Letzteres wurde als hypothetisches Protein annotiert, das wahrscheinlich löslich im Cytoplasma vorliegt. Es enthält ein Thioredoxin-Motiv (Cys-X2-Cys) und ein Häm-Bindemotiv (Cys-X2-Cys-His).

Für die Untersuchung einer möglichen Co-Transkription von *soxL* und *soxK* wurde die RNA aus einer *Alc. vinosum* Kultur extrahiert, welche zuvor mit 4 mM Thiosulfat angezogen wurde. Die RNA wurde mit „random hexamer“-Primer revers transkribiert und die nachfolgende PCR mit der erhaltenen cDNA und spezifischen Primern durchgeführt (RT-PCR). Die Positionen der erwarteten Amplikons sind in **Abbildung 3.13 A** und die erhaltenen Produkte in **Abbildung 3.13 B** dargestellt. Mit den Primer-Paaren für die Kontrollen (*soxK* bzw. *soxL*) wurden Amplikons mit einer Länge von 140 bzw. 134 Basenpaaren erhalten (**Abb. 3.13 B**; Bande 1 und 2). Dies zeigt, dass in Anwesenheit von Thiosulfat beide Gene transkribiert werden.

Mit den spezifischen Primern, die eine mögliche Co-Transkription von *soxK* und *soxL* aufzeigen sollten, wurden ebenfalls Amplikons von 141 bzw. 705 Basenpaaren erhalten (**Abb. 3.13 B**; Linie 3 und 4). Die Gene *soxK* und *soxL* werden also in Anwesenheit von Thiosulfat auf einem Leseraster transkribiert, wodurch man die transkriptionelle Einheit als *soxXAKL* zusammenfassen kann.

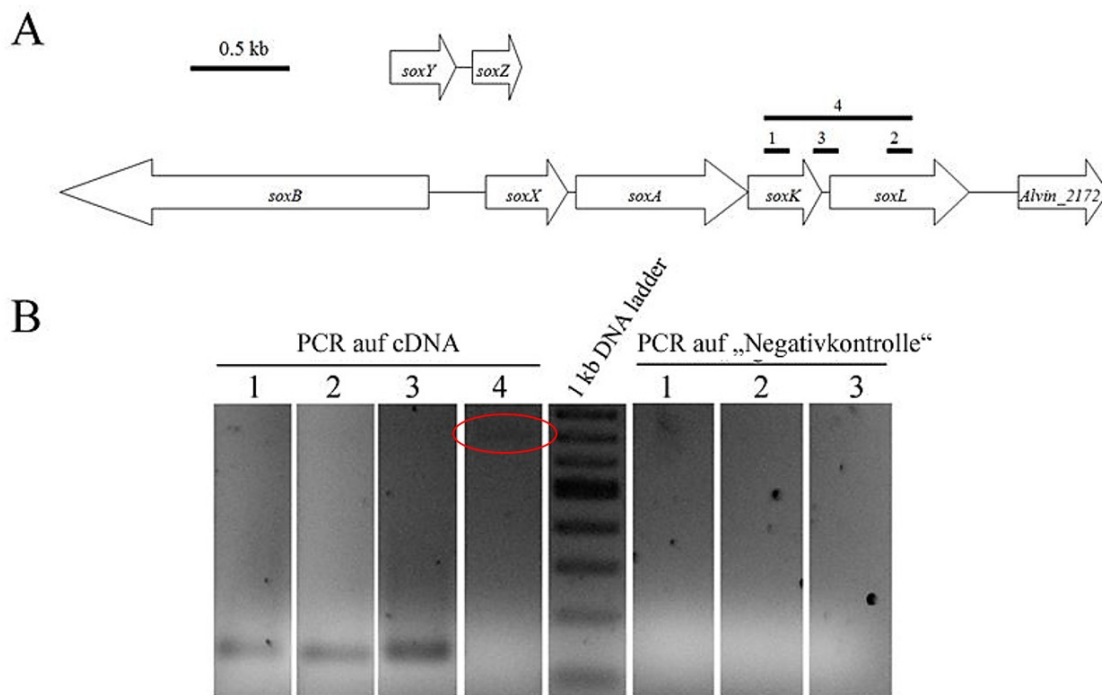


Abbildung 3.13: **Schematischer Überblick des Sox-Genclusters (A) und die Analysen der Co-Transkription von *soxK* und *soxL* (B).** **A:** Erwartete Amplicons sind als schwarze Balken dargestellt. **B:** Erhaltene Amplicons nach RT-PCR-Reaktionen, welche mit spezifischen Primern durchgeführt wurden: 1: 140 bp (*soxK*); 2: 134 bp (*soxL*); 3: 141 bp (*soxK-soxL*); 4: 705 bp (*soxK-SoxL*).

### 3.3.2 Physiologische Untersuchung der *Alc. vinosum* $\Delta soxK$ Mutante

Hierfür wurde eine *in frame*-Deletionsmutante *Alc. vinosum*  $\Delta soxK$  (Katja Kirsch; persönliche Mitteilung) hergestellt, von mir mittels Southern Blot überprüft und von Christina Molitor, deren Bachelorarbeit ich betreute, phänotypisch untersucht.

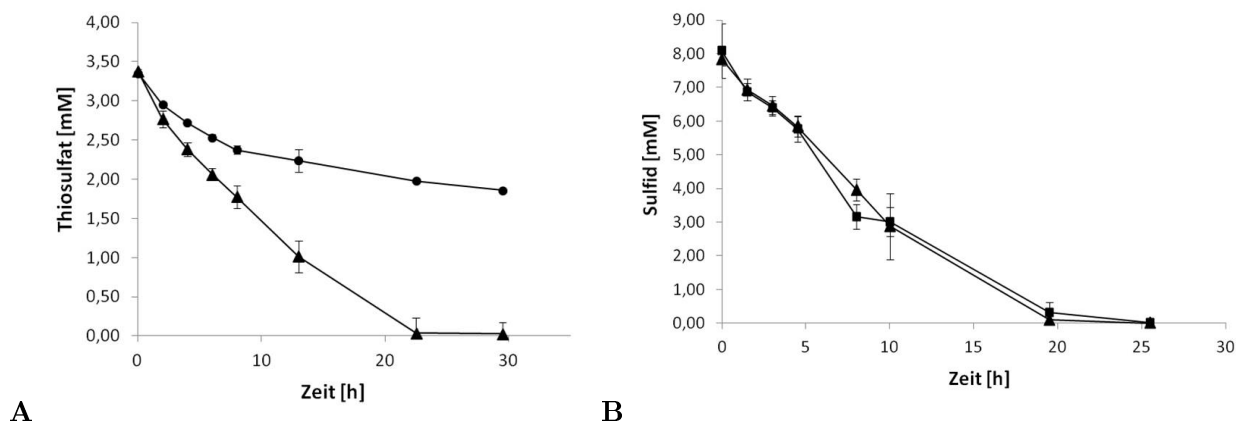


Abbildung 3.14: **Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen durch *Alc. vinosum* Wildtyp (▲) und *Alc. vinosum*  $\Delta soxK$  (■).** Gezeigt ist der Verlauf der Thiosulfat- bzw. der Sulfidoxidation. **A** Ergebnisse von Christina Molitor (Bachelorarbeit). **B** Ergebnisse dieser Arbeit.

Hierbei wurde die Thiosulfatoxidation im „Batch“-Verfahren untersucht, wobei *Alc. vinosum* Wildtyp als Standard diente. Die Deletionsmutante war nicht in der Lage 4 mM Thiosulfat vollständig zu oxidieren. 2 mM Substrat verblieben nach 30 Stunden photolithoautotrophen Wachstum im Medium (**Abb. 3.14 A**). Die abgeleiteten Schwefel- und Sulfatbildungsraten zeigen weiterhin, dass fast kein intrazellulärer Schwefel und ebenfalls kaum Sulfat produziert wurde (**Tabelle 3.12**).

Tabelle 3.12: **Schwefel- und Sulfatbildungsraten von *Alc. vinosum* Wildtyp (Wt) und  $\Delta$ soxK während des photolithoautotrophen Wachstums auf 4 mM Thiosulfat bzw. 8 mM Sulfid.**

	Schwefelbildungsrate [nmol min <sup>-1</sup> (mg Protein) <sup>-1</sup> ]	Sulfatbildungsrate [nmol min <sup>-1</sup> (mg Protein) <sup>-1</sup> ]
<b>4 mM Thiosulfat (C. Molitor)</b>		
<i>Alc. vinosum</i> WT	18,4 +/- 0,73	46,4 +/- 1,06
$\Delta$ soxK	0,8 +/- 0,79	3,04 +/- 0,41
<b>8 mM Sulfid (diese Arbeit)</b>		
<i>Alc. vinosum</i> WT	28,2 +/- 1,13	4,9 +/- 0,35
$\Delta$ soxK	28,1 +/- 0,67	3,8 +/- 0,02

Das gleiche „Batch“-Verfahren wurde von mir auch mit 8 mM Sulfid als Substrat durchgeführt. Hier waren Sulfidoxidation, Schwefel- und Sulfatbildung nicht eingeschränkt und verhielten sich wie beim *Alc. vinosum* Wildtyp (**Abb. 3.14 B**; **Tabelle 3.12**). SoxK scheint somit essentiell für die vollständige Oxidation von Thiosulfat zu sein. Die Oxidation von Sulfid, die von anderen Proteinsystemen durchgeführt wird, war dagegen nicht beeinträchtigt. Dies zeigt wiederum, dass der Effekt der Beeinträchtigung des Sox-Systems auf das Fehlen von SoxK zurückzuführen ist.

### 3.3.3 *In vitro* Analysen des vollständig rekonstituierten Sox Systems aus *Alc. vinosum*

Die rekombinanten Sox-Proteine wurden in einem modifizierten Assay untersucht, der auf eine Thiosulfat-abhängige Reduktion von Pferdeherz-Cytochrome *c* basiert (Welte et al., 2009). Hierfür wurden die Proteine, zusammen mit Thiosulfat und Cytochrome *c*, vorsichtig in einer Küvette gemischt, wobei die Reaktion mit 1  $\mu$ M SoxYZ gestartet wurde. Der enzymatische Verlauf bei 550 nm zeigte, dass die Reduktion des Cytochrom *c* zunächst sehr langsam verlief („lag“-Phase), bevor ein linearer Aktivitätsbereich („Aktivitäts-Bereich“) erhalten werden konnte. Diese „lag“-Phase wurde verringert, wenn SoxYZ zuvor mit Sulfid aktiviert wurde. Hierfür wurde das Protein mit 10 mM Sulfid (30 °C; 1 h) inkubiert und anschließend einer Dialyse unterzogen, um das überschüssige Sulfid zu entfernen, welches einen Einfluss auf die Reaktion hätte nehmen können, da Sulfid allein schon eine vollständige Reduktion des Cytochrom *c* bewirkt (**Abb. 3.15**).

Mit dieser Aktivierung von SoxYZ konnte aber auch die generelle Aktivität des Systems gesteigert werden. Denn mit der Verwendung von SoxYZ „isoliert“ wurde eine Aktivität von 15,7 m( $\Delta$ E/min), mit SoxYZ „aktiviert“ aber eine Aktivität von 30,4 m( $\Delta$ E/min) gemessen.

In vorherigen Arbeiten wurde das katalytische Cystein von SoxY gegen ein Serin ausgetauscht (SoxY<sub>C152S</sub>Z). Das modifizierte Protein wurde ebenfalls heterolog produziert, aufgereinigt und im

Sox Assay getestet. Hier zeigte sich ein vollständiger Aktivitätsverlust, da die Reduktion des Cytochrom *c* ausblieb. Eine Inkubation mit Sulfid konnte nicht zu einer Aktivierung des mutierten Proteins führen. Für die Aktivität von SoxYZ und letztlich des ganzen Systems ist also das Cystein 152 in SoxY verantwortlich. Hiermit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Dialyse ausreicht, um überschüssiges Sulfid aus der Proteinlösung zu entfernen. Die reduzierte „lag“-Phase und die Aktivitätssteigerung des Systems ist wahrscheinlich auf eine strukturelle Veränderung innerhalb von SoxYZ zurückzuführen.

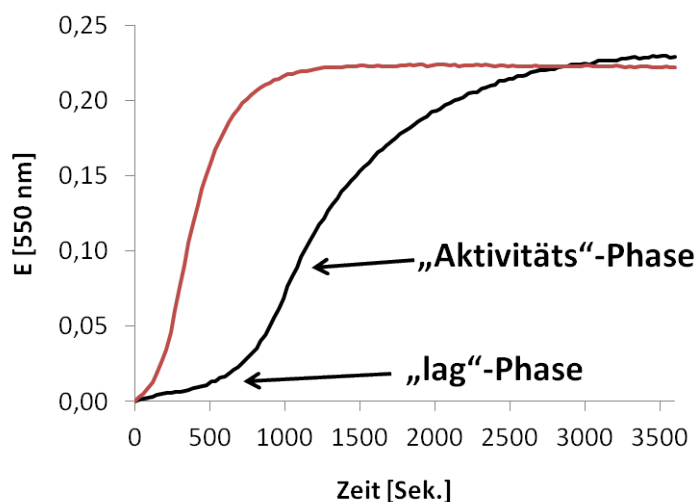


Abbildung 3.15: **Aktivität des rekonstituierten *Alc. vinosum* Sox Systems *in vitro*.** Reaktionsansätze enthielten 1  $\mu\text{M}$  SoxYZ, 0,05  $\mu\text{M}$  SoxB, 0,25  $\mu\text{M}$  SoxXAK, 35  $\mu\text{M}$  Cytochrom *c*, 100  $\mu\text{M}$  Thiosulfat bei einem pH von 6,8. Die Cytochrome *c* Reduktion wurde durch die Erhöhung der Absorption bei 550 nm aufgenommen. Die Assays wurden mit 1  $\mu\text{M}$  SoxYZ „isoliert“ (schwarze Linie) bzw. 1  $\mu\text{M}$  SoxYZ „aktiviert“ (rote Linie) durchgeführt. Die Aktivierung von SoxYZ wurde durch eine Inkubation des Proteinkomplexes mit 10 mM Sulfid (30 °C, 1h) und anschließender Dialyse erreicht.

### 3.3.4 Strukturelle Auswirkungen der Sulfid-Behandlung auf SoxYZ

Die Aktivitätssteigerung von SoxYZ durch die Sulfid-Inkubation kann mehrere Gründe haben. Zum einen könnte Sulfid eine Konformationsänderung innerhalb von SoxYZ bewirken, aber auch dafür sorgen, dass es zu einer Persulfurierung des aktiven Cysteins kommt. Eine Kombination wäre ebenfalls nicht auszuschließen.

Um eine Persulfurierung des Cystein<sub>152</sub> nachzuweisen, wurde die MALDI-TOF Massenspektrometrie verwendet. Hierbei kann prinzipiell zwischen persulfuriertem und nicht-persulfuriertem Protein unterschieden werden, da eine zusätzliche Masse von 32 Da pro zusätzlich gebundenem Schwefelatom auftritt. SoxYZ „isoliert“ zerfiel während der Analyse in beide Untereinheiten und man erhielt die Massen 12,62 kDa (SoxZ: 12,62 kDa, berechnet ohne Startmethionin) und 12,83 kDa (SoxY: 12,84 berechnet, mit Startmethionin), welche den errechneten Massen entsprechen (**Abb. 3.16 A**). SoxYZ „aktiviert“ zeigte bei diesen Analysen kein zusätzlich gebundenes Schwefelatom, da eine zusätzliche Masse von 32 Da bei SoxY ausblieb (**Abb. 3.16 B**). Dies könnte darauf hindeuten, dass SoxYZ bei der Inkubation mit Sulfid nicht persulfuriert wird.

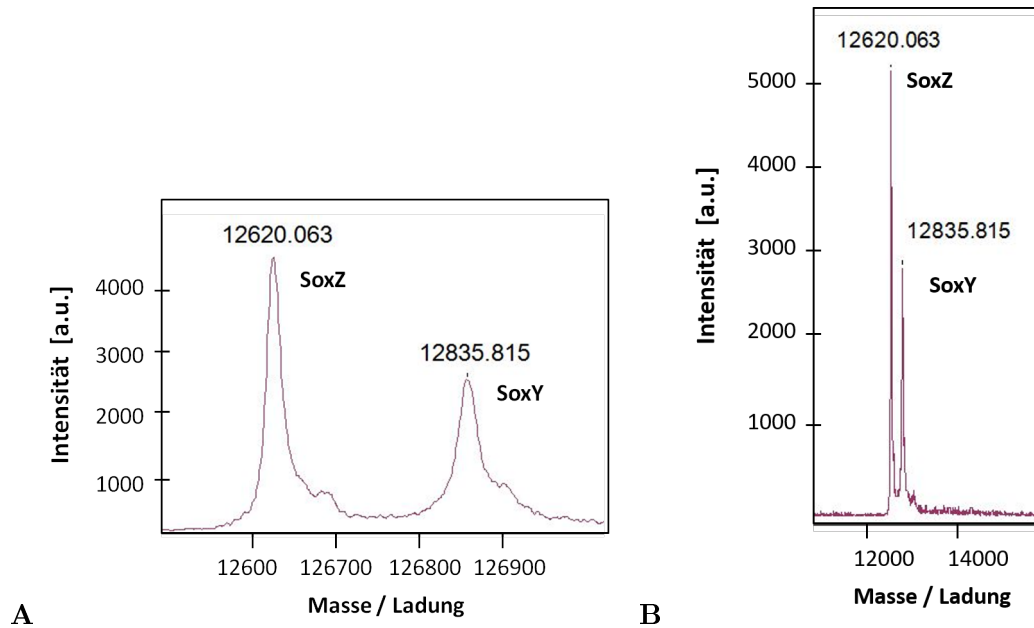


Abbildung 3.16: **MALDI-TOF Massenspektrometrie von SoxYZ „isoliert“ (A) und SoxYZ „aktiviert“ (B).** **A:** SoxYZ „isoliert“ wurde direkt für die Massenspektrometrie präpariert. **B:** 30  $\mu$ M SoxYZ wurde mit 2 mM Sulfide bei 30° C für eine Stunde inkubiert. Überschüssiges Sulfid wurde durch Gelfiltration entfernt.

Eine weitere Möglichkeit die Persulfurierung von SoxYZ nachzuweisen, bot die Analyse mit dem Thiol-reaktiven und fluoreszierenden Reagenz 1,5-I-AEDANS und wurde anhand von Thomé et al. (2012) durchgeführt. Dafür wurden SoxYZ „isoliert“ bzw. SoxYZ „aktiviert“ mit 1,5-I-AEDANS inkubiert. Das Reagenz kann nun an freie Cysteine oder an persulfurierte Cysteine im Protein binden. Die Proben wurden dann auf eine SDS-Page geladen und durch anschließende UV-Belichtung konnten die mit 1,5-I-AEDANS-gebundenen und fluoreszierenden Proteinbanden untersucht werden (**Abb. 3.17**; - Proben). Um allerdings die persulfurierten von den nicht-persulfurierten Proteinen zu unterscheiden, wurden die Proben nach der 1,5-I-AEDANS-Behandlung aufgeteilt. Zu einer Hälfte wurde das Reduktionsmittel DTT hinzugegeben, welches nur in der Lage ist, das 1,5-I-AEDANS vom Protein abzuspalten, wenn es zuvor mindestens ein zusätzliches Schwefelatom gebunden hatte (**Abb. 3.17**; + Proben). Die Proteinbanden würden unter diesen Bedingungen nun nicht mehr fluoreszieren. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie gefärbt, um die Anwesenheit aller Proteinbanden zu verifizieren.

Ohne vorherige Sulfid-Inkubation zeigte sich bei UV-Licht nur SoxZ als fluoreszierende Bande. Das Reagenz war also in der Lage an mindestens einem Cystein von SoxZ (zwei Cysteine sind enthalten) zu binden, welches anscheinend frei vorliegt und zugänglich für 1,5-I-AEDANS ist. Im Gegensatz dazu fand keine Bindung am katalytischen Cystein 152 von SoxY statt, welches durch strukturelle Bedingungen unzugänglich für das Reagenz sein könnte. Das Reduktionsmittel war hier nicht in der Lage 1,5-I-AEDANS abzuspalten, womit man davon ausgehen kann, dass die Cysteine in SoxZ, nach Aufreinigung des Proteinkomplexes, nicht persulfuriert vorliegen (**Abb. 3.17**; - Sulfid).



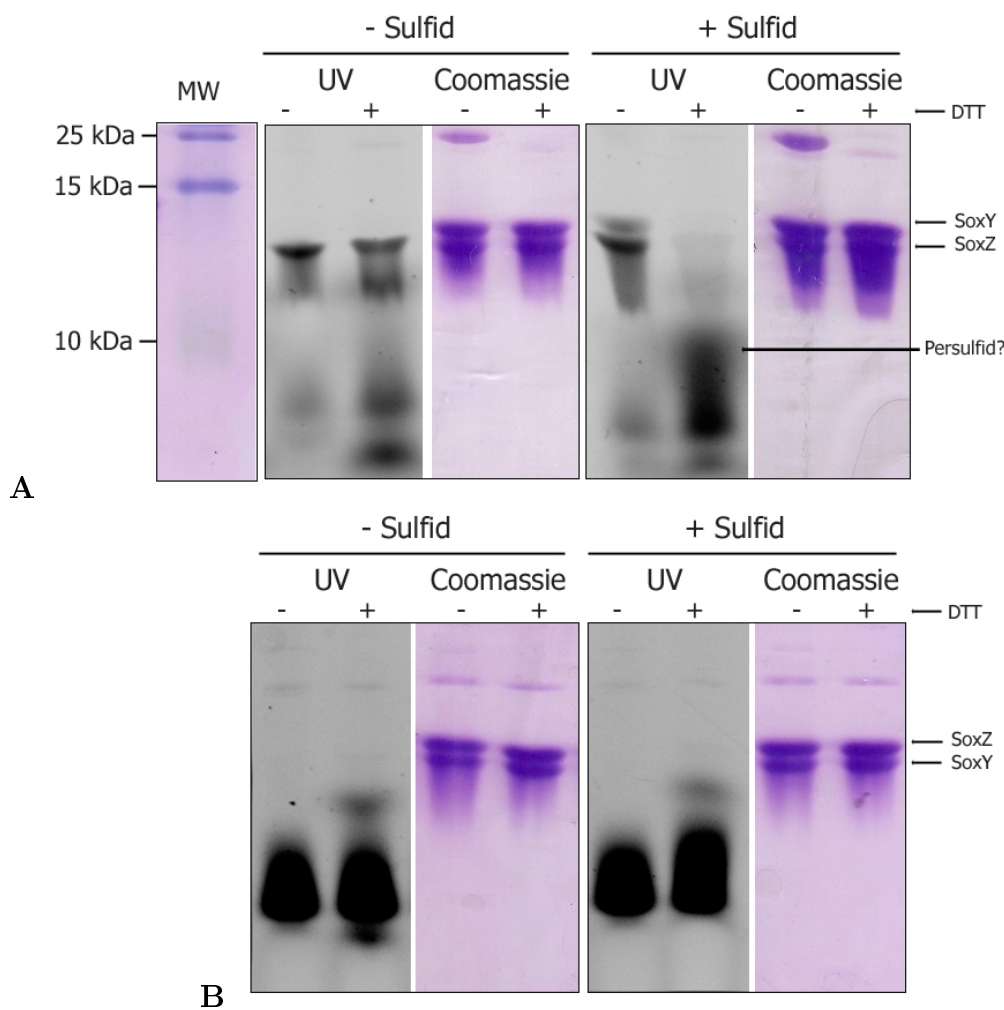


Abbildung 3.17: **Nachweis der Persulfurierung von SoxYZ (A) bzw. SoxY<sub>C152S</sub>Z (B) mittels 1,5-I-AEDANS-Behandlung.** Jede Spur enthielt 16 µg Protein, das mit 2 µM 1,5-I-AEDANS inkubiert wurde (4 °C, 1h). Darauf folgte die Zugabe von 0,77 mM Cystein (30 min. at RT), um überschüssiges 1,5-I-AEDANS zu entfernen. + / - deutet die zusätzliche bzw. fehlende Inkubation mit 7 mM DTT (30 min bei RT) an. Die Proteine wurden auf eine SDS-Page geladen, welche nach dem Lauf mit UV-Licht untersucht wurde. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie gefärbt.

Nach Sulfid-Inkubation und 1,5-I-AEDANS-Behandlung waren sowohl SoxZ, als auch SoxY als fluoreszierende Banden erkennbar. SoxY scheint also in Anwesenheit von Sulfid eine Konformationsänderung vorzunehmen, bei welcher das katalytische Cystein offener und zugänglicher vorliegt. Durch die Anwesenheit von DTT wurde das gebundene 1,5-I-AEDANS abgespalten und beide Banden sind unter UV-Licht nicht mehr sichtbar (**Abb. 3.17**; + Sulfid). Dies bedeutet, dass sowohl an SoxZ sowie an SoxY mindestens ein zusätzliches Schwefelatom gebunden sein sollte. In einigen Fällen kann man das abgespaltene Persulfid sehen, allerdings konnte die Anwesenheit nicht in allen 1,5-I-AEDANS-Experimenten nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den MALDI-TOF-Experimenten, konnte hier eine deutliche Persulfurierung der Cysteine in SoxYZ nachgewiesen werden. Aber auch eine mögliche Konformationsänderung scheint hier die Zugänglichkeit des katalytischen Cysteins in SoxY nach Sulfidbehandlung zu beeinflussen.

Das mutierte SoxY<sub>C152S</sub>Z war hingegen nicht in der Lage 1,5-I-ADAENS zu binden, da keine

fluoreszierenden Banden unter UV-Belichtung auftraten. Auch die Cysteine in SoxZ, welche unmodifiziert vorlagen, konnten das Reagenz nicht binden (**Abb. 3.17 B**).

### 3.3.5 Oligomerisierung von SoxYZ

In den zuvor beschriebenen Experimenten betrachtete man beide Untereinheiten des Proteinkomplexes SoxYZ getrennt voneinander. Eine Oligomerisierung zu einem aktiven SoxYZ (aus *Paracoccus pantotrophus*) wurde aber bereits von Quentmeier et al. (2007) beschrieben und sollte in den folgenden Experimenten für SoxYZ aus *Alc. vinosum* mittels Gelfiltrationschromatographie näher untersucht werden.

Nach diesem weiteren Aufreinigungsschritt erhielt man unterschiedliche Fraktionen, welche entweder die heterodimere (SoxYZ) bzw. die heterotetramere (SoxYZ)<sub>2</sub> Form enthielten (**Abb. 3.18**). Fraktionen beider Formen wurden getrennt voneinander gesammelt und das Protein mittels einer Spin-Säule (Amicon® Pro Purification System) aufkonzentriert.

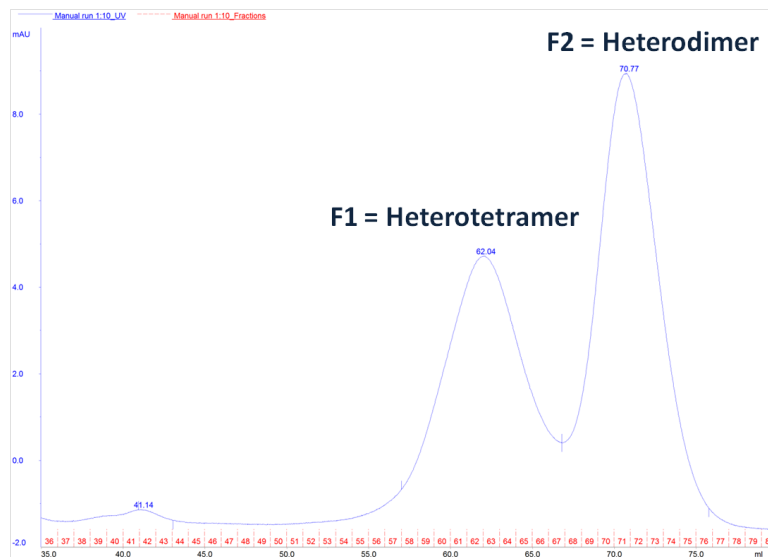


Abbildung 3.18: **Gelfiltrationschromatographische Aufreinigung von SoxYZ.** SoxYZ wurde auf eine Superdex 75 Säule geladen. Der verwendete Puffer enthielt 50 mM TrisHCl und 150 mM NaCl (pH 8) und die einzelnen Fraktionen wurden mit einem Volumen von 1 mL von der Säule eluiert. Die heterotetramere Form wurde in den Fraktionen 61 bis 63 und die heterodimere Form in den Fraktionen 70 bis 72 eluiert, gesammelt und aufkonzentriert.

Bei der Auftragung des mutierten SoxY<sub>C152S</sub>Z auf die Gelfiltrationschromatographiesäule erhielt man nur die heterodimere Form (**Abb. 3.19**). Dies zeigt, dass die Oligomerisierung zur heterotetrameren Form nur möglich ist, wenn das katalytische Cystein in SoxY vorhanden ist. Die heterodimere Form konnte hingegen auch ohne das Cystein ausgebildet werden.

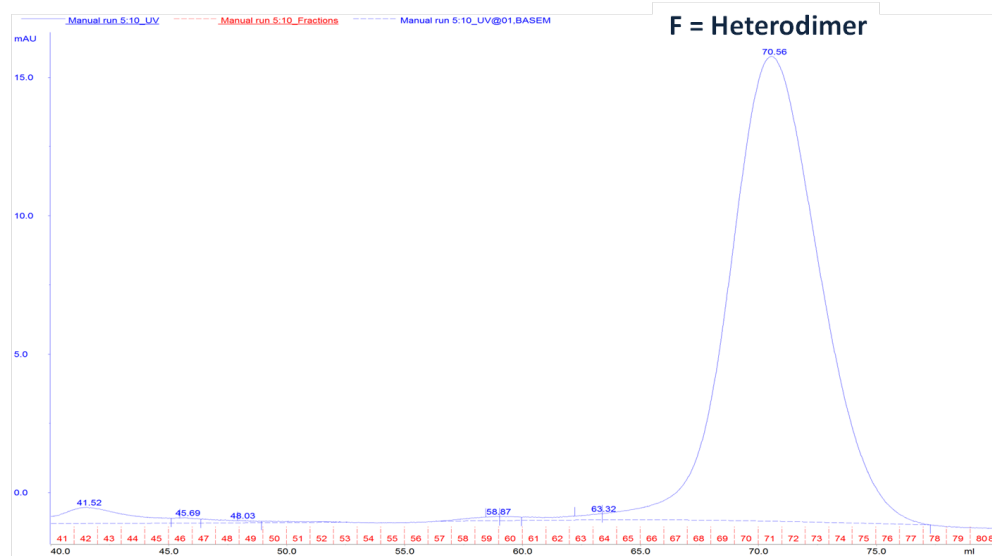


Abbildung 3.19: **Gelfiltrationschromatographische Aufreinigung von SoxY<sub>C152S</sub>Z.** SoxY<sub>152</sub>Z wurde auf eine Superdex 75 Säule geladen. Der verwendete Puffer enthielt 50 mM TrisHCl und 150 mM NaCl (pH 8) und die einzelnen Fraktionen wurden mit einem Volumen von 1 mL von der Säule eluiert. Die heterodimere Form wurde in den Fraktionen 70 bis 72 eluiert, gesammelt und aufkonzentriert.

Anschließend wurden alle erhaltenen Fraktionen entweder direkt auf eine Native-Page geladen oder mit 50  $\mu$ M TCEP, 10 mM Sulfid bzw. 100  $\mu$ M Thiosulfat vorbehandelt (30 °C; 1 h) und anschließend auf das Gel aufgetragen. Hier zeigten sich zwei Banden unterschiedlicher Laufhöhen. Die heterotetramere Form (F1) ist als obere Bande und die heterodimere Form (F2) als untere Bande zu erkennen (**Abb. 3.20**).

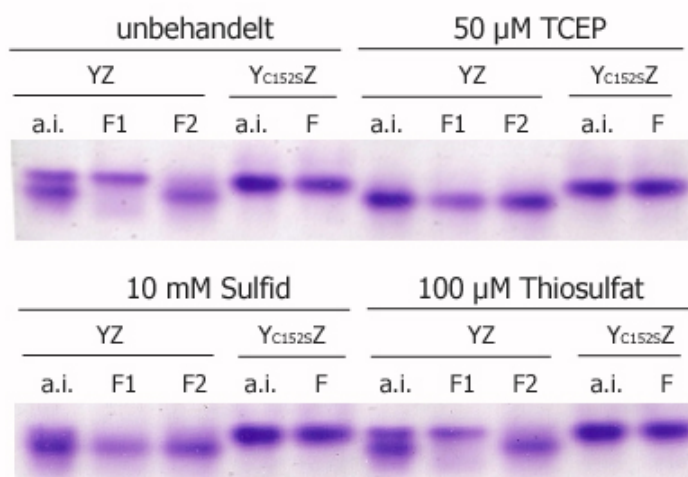


Abbildung 3.20: **Native-Page Ergebnisse der erhaltenen Formen von SoxYZ und SoxY<sub>C152S</sub>Z vor bzw. nach Gelfiltrationschromatographie.** 150 pmol jeder Probe wurde entweder direkt auf die Native-Page (7,5 %ig) geladen oder mit 50  $\mu$ M TCEP, 10 mM Sulfid oder 100  $\mu$ M Thiosulfat vorbehandelt (30 °C; h). Die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassie. F1: Heterotetramere Form (SoxYZ); F2: Heterodimere Form (SoxYZ). F: Heterodimere Form (SoxY<sub>C152S</sub>Z)

Die Native-Page zeigte, dass direkt isoliertes SoxYZ (nach Ni-NTA Affinitätschromatographie) sowohl in der heterodimeren, als auch in der heterotetrameren Form vorkommt. Die gleichen Ergebnisse wurden erhalten, wenn man SoxYZ „isoliert“ vorab mit Thiosulfat inkubierte. Dies zeigt, dass Thiosulfat allein keinen Einfluss auf die Struktur von SoxYZ hat. TCEP bzw. Sulfid reduzierten dagegen alle behandelten Fraktionen zur heterodimeren Form. Alle Proben von SoxY<sub>C152S</sub>Z zeigten unter allen Bedingungen gleich hohe Proteinbanden, welche der heterodimeren Form zugeordnet wurden (nach Gelfiltrationschromatographie), obwohl es so scheint, als ob es in der heterotetrameren Form laufen würde. Dies ist womöglich damit zu begründen, dass SoxYZ<sub>C152S</sub> eine negative Ladung weniger besitzt, als das Wildtyp-SoxYZ und somit ein anderes Laufverhalten im nativen Gel zeigt. Die Ergebnisse zeigen erneut, dass ohne das katalytische Cystein keine Oligomerisierung zur heterotetrameren Form gebildet werden kann.

### 3.3.6 Der Einfluss der SoxYZ-Oligomerisierung auf die Aktivität des Sox Systems

Die heterodimere bzw. die heterotetramere SoxYZ-Form wurde im Sox Assay eingesetzt, um ihren Einfluss auf das gesamte System zu untersuchen. Die heterodimere Form zeigte einen ähnlichen enzymatischen Verlauf mit einer „lag“-Phase, wie bereits mit SoxYZ „isoliert“ zu erkennen war (**Abb. 3.21 A**; grüne Linie). Hier wurde allerdings eine höhere Aktivität in der „Aktivitäts“-Phase gemessen (20,7 [m(ΔE/min)]), als mit SoxYZ „isoliert“. Mit der heterotetrameren Form konnte die Umsetzung des Substrates direkt verlaufen, da eine „lag“-Phase ausblieb. Die Aktivität war mit 7,5 [m(ΔE/min)] allerdings verhältnismäßig gering (**Abb. 3.21 A**; rote Linie).

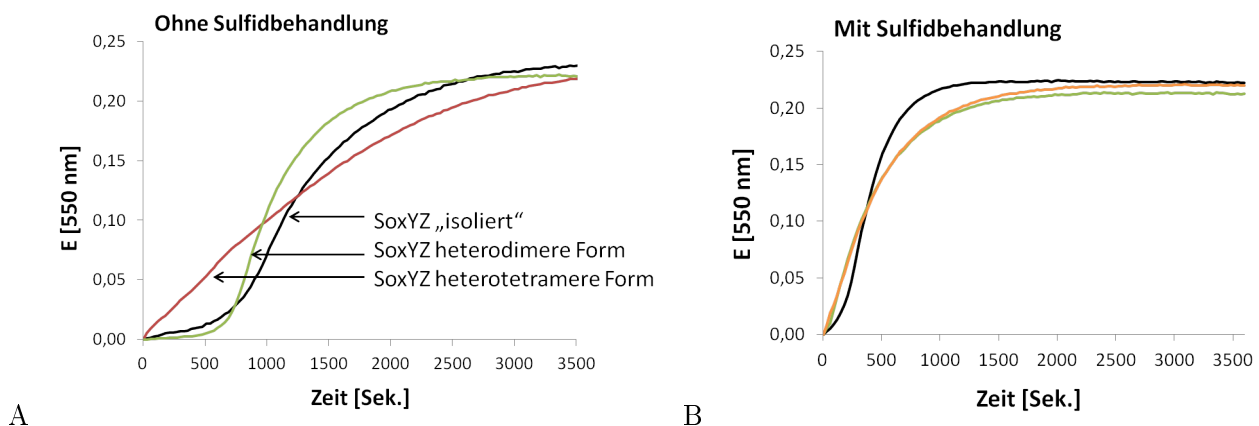


Abbildung 3.21: **Unterschiedliche enzymatische Verläufe der verschiedenen SoxYZ Formen im Sox System ohne vorherige Sulfidbehandlung (A) bzw. mit Sulfidbehandlung (B).** Die Reaktionsansätze enthielten 1  $\mu\text{M}$  SoxYZ („isoliert“, heterodimere SoxYZ Form, heterotetramere SoxYZ Form), 0,05  $\mu\text{M}$  SoxB, 0,25  $\mu\text{M}$  SoxXAK, 35  $\mu\text{M}$  Cytochrome c, 100  $\mu\text{M}$  Thiosulfat bei pH 6,8. Cytochrome c Reduktion wurde bei einer Absorption von 550 nm aufgezeichnet. **A:** SoxYZ „isoliert“ (schwarze Linie), heterotetramere SoxYZ Form (grüne Linie), heterodimere SoxYZ Form (rote Linie). **B:** SoxYZ „aktiviert“ (schwarze Linie). Heterodimere SoxYZ Form (orangene Linie). SoxYZ „aktiviert“ + Gelfiltrationschromatographie (grüne Linie).

Wie bereits gezeigt, konnte die „lag“-Phase von SoxYZ „isoliert“ durch vorherige Sulfidbehandlung verringert werden. Dies zeigte sich ebenfalls für die heterodimere Form von SoxYZ (**Abb. 3.21 B**; orangene Linie). Eine weitere Aktivitätssteigerung wurde dadurch allerdings nicht erreicht (23,5

[m( $\Delta E$ /min))]. Eine Sulfidbehandlung mit der heterotetrameren Form war nicht möglich, da zu wenig Protein nach der Gelfiltrationschromatographie erhalten wurde.

SoxYZ „aktiviert“ (SoxYZ „isoliert“ nach Sulfidbehandlung) wurde ebenfalls auf eine Gelfiltrationschromatographiesäule gegeben und man erhielt nur die heterodimere Form, was den Ergebnissen der Native-Page entspricht. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen und Konzentrierung des Proteins, wurde auch diese Probe in einem Sox Assay eingesetzt. Auch hier war die „lag“-Phase stark reduziert und man erhielt eine Aktivität von 20,0 [m( $\Delta E$ /min)] (**Abb. 3.21 B**; grüne Linie).

Alle Aktivitäten, als auch die zeitliche Dauer der unterschiedlichen „lag“-Phasen, sind in **Tabelle 3.13** aufgezeigt.

Tabelle 3.13: **Überblick der erhaltenen Aktivitäten und zeitlichen Dauern der „lag“-Phasen des Sox Systems mit diversen SoxYZ Formen.**

SoxYZ Form	„Aktivitäts“-Phase [m( $\Delta E$ /min)]	„lag“-phase [min]
<b>ohne Sulfidbehandlung</b>		
SoxYZ „isoliert“	15,7	14,8
(SoxYZ) <sub>2</sub> *	7,5	0
(SoxYZ)*	20,7	12,8
<b>mit Sulfidbehandlung</b>		
SoxYZ „aktiviert“	30,4	3,6
(SoxYZ) <sup>1</sup>	23,5	0,5
(SoxYZ) <sup>2</sup>	20,0	0

(SoxYZ): heterodimere Form; (SoxYZ)<sub>2</sub>: heterotetramere Form

\*erhalten nach Gelfiltrationschromatographie

<sup>1</sup>Heterodimere Form erhalten nach Gelfiltrationschromatographie und Sulfidbehandlung

<sup>2</sup>SoxYZ „aktiviert“ erhalten nach Sulfidbehandlung mit anschließender Gelfiltrationschromatographie

### 3.4 Untersuchungen zum Rhodanese-ähnlichen Protein SoxL

Das für das Rhodanese-ähnliche Protein kodierende Gen *soxL* (Alvin\_2171) ist stromabwärts des *soxXAK* Genclusters lokalisiert. Durch das Motiv CNGIWC in der Peptidsequenz wurde es in den Datenbanken als Rhodanese annotiert, obwohl dieses Motiv stark von den üblichen Rhodanese-motiven (CRXGX[R/T]; CG[S/T]GVT) abweicht. Vorherige Studien zeigten ebenso, dass ein heterolog produziertes und aufgereinigtes SoxL *in vitro* keine Thiosulfat:Cyanid- oder eine 3-Mercaptopyruvat-Schwefeltransferaseaktivität aufweist. Im Sox Assay hinzugefügt, steigerte SoxL allerdings die Thiosulfatoxidationsrate ohne die Elektronenübertragungsrate zu erhöhen (Welte et al., 2009). Deswegen kann nicht ausgeschlossen werden, dass SoxL in der Lage ist, Schwefel zu binden oder mit einem alternativen Substrat zu interagieren.

### 3.4.1 Bioinformatische Analysen der Proteinsequenz von SoxL

Bei den durchgeführten Protein BLASTs wurden hauptsächlich ähnliche Proteine gefunden, welche den schwefeloxidierenden Chromatiaceae (*Thiocystis violascens* DSM 198 und *Thiorhodococcus marina*) zugeordnet wurden (Tabelle 3.14). Diese Proteine wurden weiterhin als Schwefeltransferasen oder hypothetische Proteine annotiert. *Thiocystis violascence* besitzt das Gen Thivi\_3801, welches ein SoxL-Homolog zu sein scheint und ebenfalls stromabwärts von *soxK* (Thivi\_3802), *soxA* (Thivi\_3803) und *soxX* (Thivi\_3804) lokalisiert ist. Dies könnte bedeuten, dass das resultierende Protein eine ähnliche Funktion wie SoxL aus *Alc. vinosum* besitzen könnte.



Abbildung 3.22: **Protein-Alignment von SoxL und SoxL-Homologen aus unterschiedlichen Bakterienarten der Chromatiaceae.** Sequenzvergleiche wurden mit ClustalW erzeugt (Chenna et al., 2003). Rhd: Rhodanese; Mpur: *Marichromatium purpuratum*; Lam: *Lamprocystis purpurea*; Alv: *Allochromatium vinosum*; Tvi: *Thiocystis violascens*; Thid: *Thiorhodococcus drewsii*; Thim: *Thiocapsa marina*; (\* - Stern): stark konservierte Reste; (: - Doppelpunkt): Konservierung zwischen Gruppen mit sehr ähnlichen Eigenschaften; (· - Punkt): Konservierung zwischen Gruppen mit weniger stark ähnlichen Eigenschaften. Das CXXXXC Motiv ist in rot, das CXXXC Motiv dagegen in blau markiert. Die Schnittstellen des Signalpeptids sind durch eine rote Linie gekennzeichnet.

Weitere Analysen zeigten, dass viele Regionen innerhalb der verglichenen Proteinsequenzen hoch konserviert sind. Unter diesen Regionen gehören zwei Motive, die jeweils zwei Cysteine enthalten (**Abb. 3.22**). Die ersten beiden Cysteine sind an den Positionen 68 und 72 lokalisiert und bilden ein CXXXC Motiv. Das katalytische Cystein 179 ist dagegen Teil eines stark abweichenden Rhodanese-motivs (vereinfacht: CXXXXC), welches ein weiteres Cystein an Position 184 besitzt. Alle verglichenen Proteinsequenzen besitzen ebenfalls ein Signalpeptid mit entsprechender Schnittstelle, was für einen aktiven Transport der Proteine ins Periplasma spricht.

Tabelle 3.14: **Abgeleitete BLAST Ergebnisse mit der Proteinsequenz von SoxL.**

Accession-Nr.	Beschreibung	Identitäten	E-wert
<b>Chromatiaceae</b>			
WP_014780034.1	Schwefeltransferase [ <i>Thiocystis violascens</i> ]	75 %	2e-117
WP_007195446.1	Schwefeltransferase [ <i>Thiocapsa marina</i> ]	73 %	4e-105
WP_007041132.1	Schwefeltransferase [ <i>Thiorhodococcus drewsii</i> ]	72 %	5e-113
WP_020506636.1	Hypothetisches Protein [ <i>Lamprocystis purpurea</i> ]	72 %	2e-100
AHF03396.1	Schwefeltransferase [ <i>Marichromatium purpuratum</i> 984]	69 %	2e-107
<b>Ectothiorhodospiraceae</b>			
WP_012638299.1	Rhodaneseähnliches Protein [ <i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i> ]	40 %	6e-39
WP_011813041.1	Thiosulfat Schwefeltransferase [ <i>Halorhodospira halophila</i> ]	24 %	0.13
<b>Andere</b>			
WP_011312162.1	Schwefeltransferase [ <i>Thiobacillus denitrificans</i> ]	51 %	7e-67
EDN67560.1	Rhodaneseähnliches Protein [ <i>Beggiatoa</i> sp. PS]	45 %	1e-58

### 3.4.2 Analyse der transkriptionellen Regulation von *soxL*

Auch für *soxL* sollten die Microarray-Ergebnisse von Weissgerber et al. (2013) mit den Ergebnissen der qRT-PCR-Daten aus dieser Arbeit verglichen werden. Bei den Microarray-Assays zeigte sich ein erhöhter mRNA-Level vor allem während des Wachstums auf Schwefel (**Tabelle 3.15**). Dies konnte ebenfalls für weitere Gene des Sox-Systems (*soxX*, *soxA*, *soxK*) bestätigt werden. Im Gegensatz dazu, waren die mRNA Level der hier genannten *sox*-Gene während des Wachstums auf Thiosulfat bzw. Sulfid nur leicht erhöht. Die bereits erwähnte Co-Transkription von *soxK* und *soxL* wurde mit diesen Daten ebenso bestätigt, da die mRNA Level der beiden Gene in einem ähnlichen Verhältnis vorlagen.

Bei den qRT-PCR-Analysen zeigte sich eine ähnliche Tendenz, wobei auch hier der Zeitraum der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen für die Regulierung von *soxL* entscheidend ist. Beim Wachstum mit 4 mM Thiosulfat war der relative mRNA Level für *soxL* nach einer Stunde erhöht, wohingegen dieser erst nach 10,5 Stunden deutlich gesunken war (**Abb. 3.23 A**).

Tabelle 3.15: Relative mRNA Level für *soxL* aus Microarray-Analysen.

Schwefelquelle:	Zellernte nach:	Relative mRNA Änderung [Microarray]*			
		<i>soxX</i>	<i>soxA</i>	<i>soxK</i>	<i>soxL</i>
4 mM Sulfid	2 Std.	1,0	0,9	0,8	1,2
10 mM Thiosulfat	1 Std.	2,0	1,8	1,5	0,8
50 mM Schwefel	3 Std.	5,8	4,9	4,2	3,5

Relative mRNA Level während des Wachstums mit 4 mM Thiosulfat, 4 mM Sulfid bzw. 50 mM Schwefel verglichen zum photoorganoheterotrophen Wachstum mit Malat. \* (Weissgerber et al., 2013)

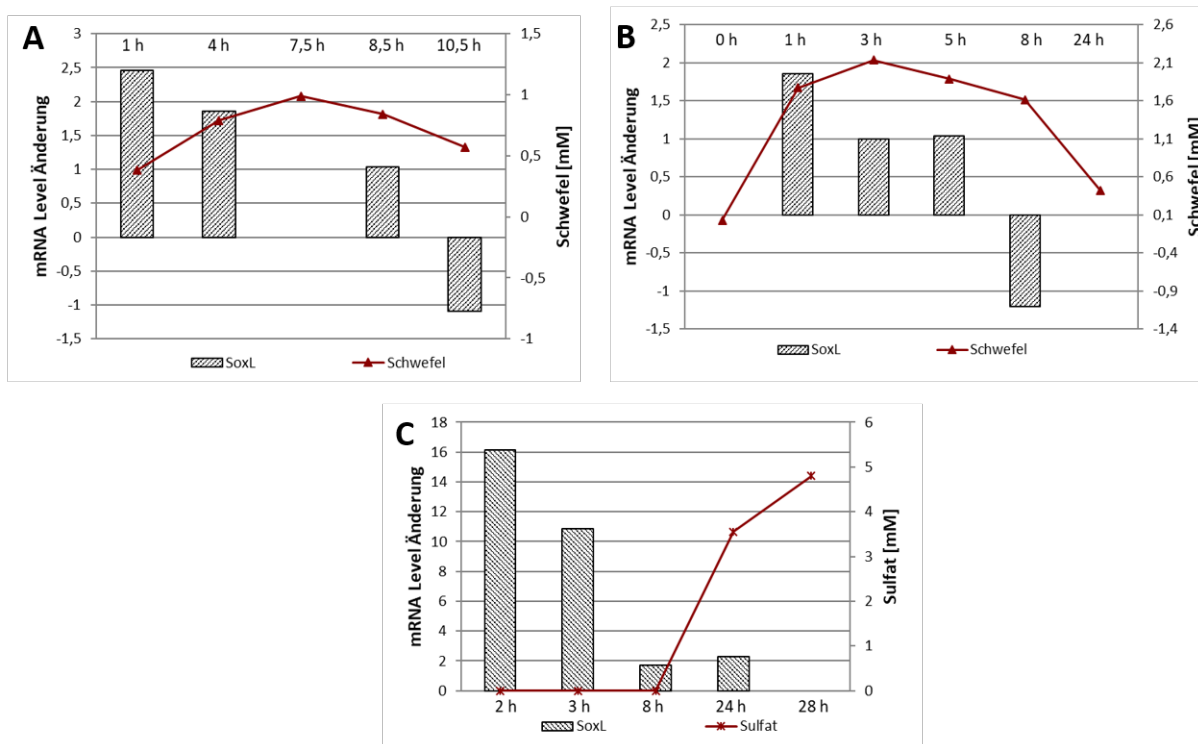


Abbildung 3.23: Relative mRNA Level von *soxL* während der Oxidation von 4 mM Thiosulfat (A), 4 mM Sulfid (B) bzw. 50 mM Schwefel (C) verglichen mit den resultierenden mRNA Levels beim photoorganoheterotrophen Wachstum. Die Kalibrierung wurde mittels Alvin\_0486 (Uroporphyrinogen Decarboxylase D), dem „Housekeeping“-Gen, erstellt. Die Zeitpunkte geben die Erntezeiten an. Schwefelkugelauf- und -abbau wurden mittels Schwefelbestimmung bestimmt.

Bei dem Wachstum mit 4 mM Sulfid waren die relativen mRNA Level für *soxL* nach einer Stunde erhöht. In diesem Zeitraum wurden Schwefelkugeln aufgebaut, was durch die intrazelluläre Schwefelgehaltsmessung angezeigt wird. Zu späteren Erntezeiten war der mRNA Level bereits gesunken (Abb. 3.23 B).

Beim Wachstum mit Schwefel waren die mRNA Level für *soxL* nach 2 Stunden sogar 16-fach erhöht und nahmen ebenfalls im Laufe der Schwefeloxidation ab, wobei die Werte immer noch im positiven Bereich blieben (Abb. 3.23 C). Die genauen Werte sind in Tabelle 3.16 zusammengefasst.



Während der Oxidation von Thiosulfat, Sulfid oder Schwefel konnte eine deutliche Variabilität der Transkriptmenge für die *soxL* gezeigt werden. Vor allem bei der Schwefeloxidation wird das Gen deutlich hochreguliert, was ebenso bei den Microarray-Ergebnissen ersichtlich war. Auch hier zeigte sich, dass die relativen mRNA Level während der Schwefelkugelformierung erhöht vorlagen, wohingegen sie beim Schwefelkugelabbau stark erniedrigt waren.

Tabelle 3.16: Relative mRNA Level für *soxL* aus qRT-PCR-Analysen.

Locus tag / Gen	Relative mRNA Änderung [qRT-PCR]											
	4 mM Thiosulfat				4 mM Sulfid				50 mM Schwefel			
	1 h	4 h	8,5 h	10,5 h	1 h	3 h	5 h	8 h	2 h	3 h	8 h	24 h
<i>soxL</i>	2,5	1,9	1,0	- 1,09	1,9	1,0	1,0	- 1,2	16,1	10,8	1,7	2,3

Die Zellen wurden photolithoautotroph mit 4 mM Sulfid, 4 mM Thiosulfat und 50 mM Schwefel angezogen. Relative mRNA Level wurden mit mRNA Level verglichen, die während photoorganoheterotrophen Wachstum erhalten wurden. Die Kalibrierung wurde mittels Alvin\_0486 (Uroporphyrinogen Decarboxylase D), dem „Housekeeping“-Gen, erstellt. Die Zeitpunkte geben die Erntezeiten an.

### 3.4.3 Herstellung rekombinanter SoxL Varianten

Um die Funktion des Rhodanese-ähnlichen Proteins näher untersuchen zu können, wurden in Zusammenarbeit mit Claudia Domin, während ihrer Bachelorarbeit (2013), rekombinante SoxL Varianten durch zielgerichtete Mutagenese hergestellt. Dabei wurden die vier Cysteine gegen Serine ausgetauscht und es entstanden 15 SoxL Varianten (Tabelle 3.17).

Tabelle 3.17: Überblick der hergestellten SoxL Mutanten.

SoxL Mutante	Beschreibung	Vorhandenes Cystein
SoxL <sub>C68S</sub>	Einfachmutante	Cys72, Cys179, Cys184
SoxL <sub>C72S</sub>	Einfachmutante	Cys68, Cys179, Cys184
SoxL <sub>C179S</sub>	Einfachmutante	Cys68, Cys72, Cys184
SoxL <sub>C184S</sub>	Einfachmutante	Cys68, Cys72, Cys179
SoxL <sub>C68,72S</sub>	Doppelmutante	Cys179, Cys184
SoxL <sub>C179,184S</sub>	Doppelmutante	Cys68, Cys72
SoxL <sub>C68,179S</sub>	Doppelmutante	Cys72, Cys184
SoxL <sub>C68,184S</sub>	Doppelmutante	Cys72, Cys179
SoxL <sub>C72,179S</sub>	Doppelmutante	Cys68, Cys184
SoxL <sub>C72,184S</sub>	Doppelmutante	Cys68, Cys179
SoxL <sub>C72,179,184S</sub>	Dreifachmutante	Cys68
SoxL <sub>C68,179,184S</sub>	Dreifachmutante	Cys72
SoxL <sub>C68,72,184S</sub>	Dreifachmutante	Cys179
SoxL <sub>C68,72,179S</sub>	Dreifachmutante	Cys184
SoxL <sub>C68,72,179,184S</sub>	Vierfachmutante	–

Dies erfolgte durch Einfügen von Punktmutationen in *soxL* mittels GeneSOEing PCR. Die hergestellten Fragmente wurden über die Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* in den Klonierungsvektor pet15b kloniert. Fertige Plasmide dienten als Vorlage für eine erneute GeneSOEing PCR, um weitere Punktmutationen einzufügen. Die Proteine wurden heterolog produziert und mittels eingefügtem His-Tag und via Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Zur besseren Übersicht werden die SoxL Varianten in den folgenden Kapiteln danach bezeichnet, welche Cysteine sie noch besitzen (Bsp.: Bei SoxL<sub>179</sub> handelt es sich um eine Dreifachmutante, da nur noch das Cystein179 vorhanden ist und alle anderen Cysteine gegen Serine ausgetauscht wurden).

#### 3.4.4 Analyse der Schwefelbindefähigkeit von SoxL

Wie bereits beschrieben, zeigte SoxL in vorherigen Experimenten keine Thiosulfat:Cyanid- oder 3-Mercaptopyruvat:Cyanid-Schwefeltransferase Aktivität (Welte et al., 2009). Auch in den Versuchen für diese Arbeit konnte keine Aktivität mit Thiosulfat oder alternativen Substraten, wie Glutathionpersulfid bzw. Polysulfiden, nachgewiesen werden. Trotzdem kann man nicht ausschließen, dass SoxL in der Lage ist, zusätzliche Schwefelatome aufzunehmen. Da SoxL mit 24,6 kDa eine große Masse besitzt, ergaben Massebestimmungen mittels MALDI-TOF keine eindeutigen Ergebnisse. Somit war die Cyanolyse ein alternativer Ansatz zur Bestimmung von zusätzlich gebundenem Schwefel. Hierfür wurde SoxL mit dem reaktiven Substrat Sulfid inkubiert (30 °C; 1 h). Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben dialysiert, um überschüssiges Sulfid zu entfernen, um letztlich nur die Schwefelatome bestimmen zu können, welche von SoxL gebunden wurden. Die Schwefelbestimmung wurde kolorimetrisch bestimmt (modifiziert nach Bartlett and Skoog (1954)). Diese Versuche wurden mit SoxL, als auch mit allen SoxL Varianten, durchgeführt.

Durch die Cyanolyse konnten nach Sulfidinkubation (und Dialyse) vier zusätzlich gebundene Schwefelatome an SoxL bestimmt werden (**Tabelle 3.18**). Hierbei handelt es sich aber nicht um absolute Zahlen, da die Schwefelbestimmung mittels Cyanolyse diverse Fehlerquellen besitzt. Weiterhin könnten mögliche Schwefelbrückenbindungen zwischen bestimmten Cysteinen so stark sein, dass Cyanid diese nicht vollständig lösen kann und somit einige gebundene Schwefelatome nicht nachweisbar sind.

Trotzdem konnte gezeigt werden, dass alle Cysteine (außer Cys<sub>184</sub>) in der Lage sind, zusätzlichen Schwefel zu binden. Die Vierfachmutante, deren Cysteine vollständig gegen Serine ausgetauscht wurden, konnte hingegen keinen Schwefel binden. Zudem wurden diverse Kontrollen durchgeführt. Hierbei wurde ein Teil der Proben (nach Sulfidinkubation und Dialyse) mit dem Reduktionsmittel DTT versetzt und erneut dialysiert. In diesen Proben konnte ebenfalls kein Schwefel nachgewiesen werden, da dieser vom Reduktionsmittel abgespalten und durch die Dialyse entfernt wurde. Diese Versuche zeigten, dass SoxL trotz fehlender Rhodanese-Aktivität, durchaus Schwefelatome binden kann.

Tabelle 3.18: **Schwefelbindefähigkeit von SoxL und SoxL Varianten.**

SoxL / SoxL Variante	Anzahl zusätzlicher Schwefelatome
SoxL	~ 4
SoxL <sub>68</sub>	~ 3
SoxL <sub>72</sub>	~ 3
SoxL <sub>179</sub>	~ 2
SoxL <sub>184</sub>	~ 0
SoxL <sub>68,72</sub>	~ 3
SoxL <sub>68,179</sub>	~ 2
SoxL <sub>68,184</sub>	~ 2
SoxL <sub>72,179</sub>	~ 3
SoxL <sub>72,184</sub>	~ 4
SoxL <sub>179,184</sub>	~ 2
SoxL <sub>68,179,184</sub>	~ 2
SoxL <sub>72,179,184</sub>	~ 3
SoxL <sub>68,72,179</sub>	~ 3
SoxL <sub>68,72,184</sub>	~ 3
SoxL <sub>--</sub>	~ 0

### 3.4.5 Bildung von Polysulfiden durch SoxL in Anwesenheit von Sulfid

Während der Sulfid-Inkubation mit SoxL konnte eine Gelbfärbung der Lösung beobachtet werden. Diese verstärkte sich im Laufe der Inkubation und wurde nach einer Weile (abhängig vom Proteingehalt) wieder schwächer. Nach anschließender Dialyse (über Nacht bei 4 °C) fiel weiterhin auf, dass sich ein weiß-trüber Film in den Dialyseschläuchen gebildet hatte, welcher zunächst für ausgefallenes Protein gehalten wurde. Bei näheren Untersuchungen stellte sich allerdings heraus, dass SoxL in der Lage war Polysulfide aus Sulfid zu bilden, die bei aerober Inkubation zu Schwefel zerfielen.

Diese Rückschlüsse beruhen auf mehreren Versuchen. Hierfür wurde ein Probeansatz (10 mM TrisHCl (pH 8) + 400 µg SoxL + 5 mM Sulfid) mit einem Kontrollansatz (10 mM TrisHCl (pH 8) + 5 mM Sulfid) verglichen. Während im Kontrollansatz das Sulfid im Laufe der Zeit konstant nachgewiesen werden konnte, wurde dieses im Probeansatz scheinbar durch SoxL verbraucht. Nach 300 Minuten waren wiederum 1 mM Schwefel gebildet worden, welcher im Kontrollansatz nicht nachzuweisen war (**Abb. 3.24 A**). Nach Ablauf der Messungen wurde ein Spektrum der gelb gefärbten Lösung aufgenommen. Verglichen mit dem Spektrum einer hergestellten Polysulfidlösung, befanden sich Polysulfide (Peak bei ca. 360 nm) im Probeansatz, nicht aber im Kontrollansatz (**Abb. 3.24 B**).

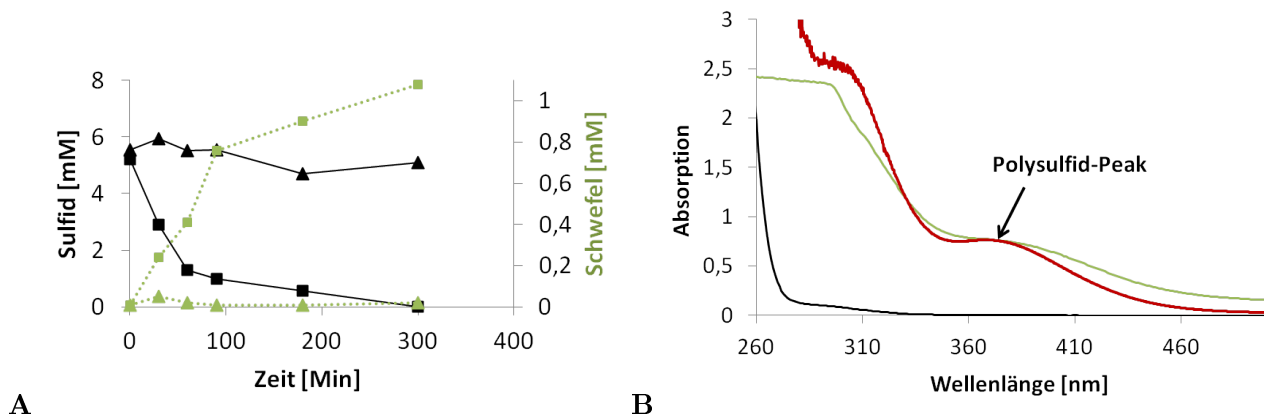


Abbildung 3.24: **Sulfid- und Schwefelbestimmung (A) bzw. spektraler Polysulfidnachweis (B) während der Inkubation von SoxL mit Sulfid.** **A** Schwefelbestimmung: ▲.. Kontrollansatz; ■.. Probenansatz (modifiziert nach Bartlett and Skoog (1954)). Sulfidbestimmung: ▲\_ Kontrollansatz; ■\_ Probenansatz (modifiziert nach Cord-Ruwisch (1985)). **B** Kontrollansatz (schwarze Linie), Probenansatz (grüne Linie); Polysulfidlösung (rote Linie).

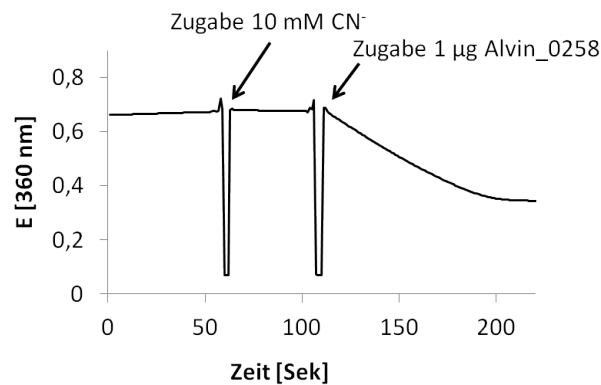


Abbildung 3.25: **Enzymatischer Verlauf der Polysulfid:Cyanid Schwefeltransferase Aktivität von Alvin\_0258 mit Polysulfiden, hergestellt von SoxL.** 400 µg SoxL wurden mit 10 mM Sulfid (10 mM TrisHCl; pH 8) bei 30 °C für eine Stunde inkubiert. Diese Lösung wurde für den Assay verwendet, indem eine photometrische Messung bei 360 nm durchgeführt wurde. Zu Beginn zeigt sich eine Basislinie, die durch das Hinzufügen von 10 mM Cyanid nicht beeinflusst wird. Erst bei der Zugabe von 1 µg Alvin\_0258 zeigt sich, durch die Abnahme der Extinktion bei 360 nm, die Übertragung des Schwefels von den Polysulfiden auf Cyanid.

In einem Polysulfid:Cyanid Schwefeltransferase Assay konnte weiterhin gezeigt werden, dass Alvin\_0258, die von SoxL hergestellten Polysulfide, als Substrat verwenden konnte (**Abb. 3.25**).

Die Eigenschaft Polysulfide aus Sulfid zu bilden, konnte nur für SoxL bestätigt werden. Die Rhodanese Alvin\_0258 verbrauchte zwar Polysulfide, konnte selber aber keine bilden. Dies wurde durch Verlaufsmessungen bei einer Absorption von 360 nm gezeigt. Hierfür wurden SoxL bzw. Alvin\_0258 und alle SoxL Varianten mit 20 mM Sulfid in einer 96er well-Platte inkubiert und die Absorptionen konnten in engen Zeiträumen, mittels Plattenlesegerät, gemessen werden (**Abb. 3.26**).

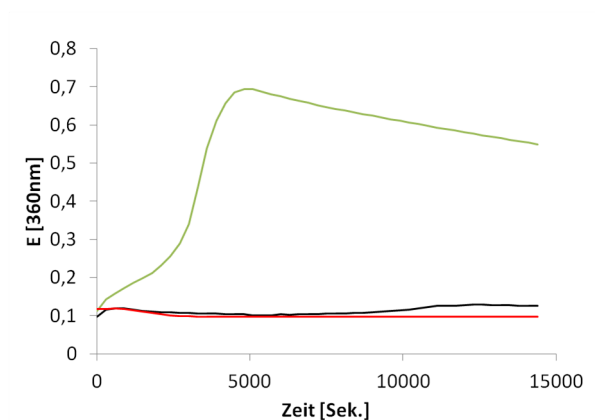


Abbildung 3.26: **Reaktionsverlauf der Polysulfidbildung durch SoxL bei 360 nm.** Je 50  $\mu\text{g}$  Protein wurde in eine 96er well-Platte hinzugegeben (50 mM TrisHCl; pH 8). Die Polysulfidbildung mit 20 mM Sulfid gestartet und in einem Plattenlesegerät bei 360 nm gemessen. – Kontrollansatz: Puffer + Sulfid; – Puffer + Sulfid + SoxL; – Puffer + Sulfid + Alvin\_0258

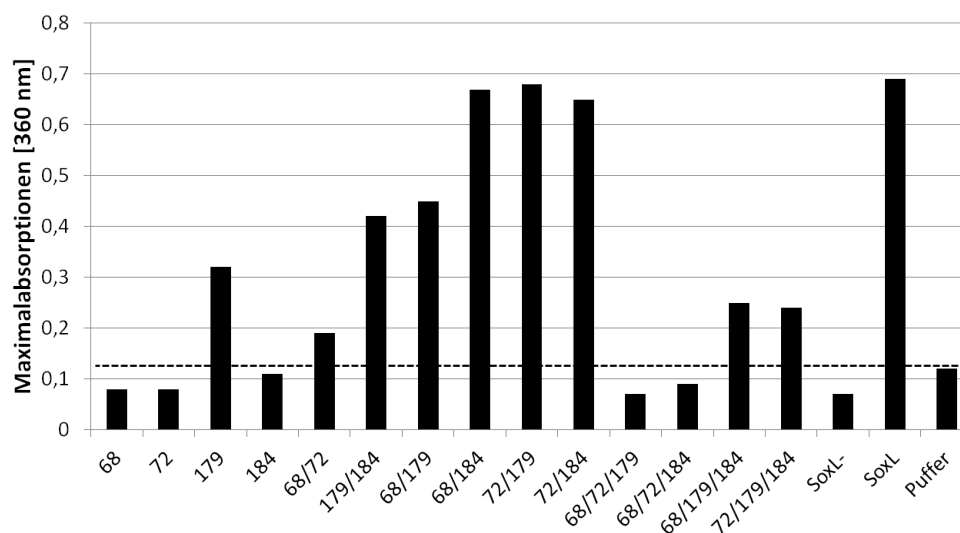


Abbildung 3.27: **Erhaltene Maximalabsorptionen bei 360 nm während der Inkubation von SoxL bzw. SoxL Varianten mit Sulfid.** Je 50  $\mu\text{g}$  Protein wurde in eine 96er well-Platte gegeben (50 mM TrisHCl; pH 8). Die Polysulfidbildung wurde mit 20 mM Sulfid gestartet und in einem Plattenlesegerät bei 360 nm gemessen. Die unten stehenden Nummern geben die SoxL Varianten an, welche die entsprechenden Cysteine besitzen. SoxL- ist die Vierfachmutante, deren Cysteine komplett gegen Serine ausgetauscht wurden.

Die SoxL Varianten zeigten bei dieser Inkubation unterschiedliche Maximalabsorptionen, was auf eine Abhängigkeit der Cysteine gegenüber der Polysulfidbildung hindeutet (**Abb. 3.27**). Die Ergebnisse sind hierbei nicht konsistent und man kann nur Tendenzen erkennen. SoxL Varianten, die nur noch ein Cystein besaßen, schienen die Polysulfidbildungsfähigkeit verloren zu haben (außer bei SoxL<sub>179</sub>). Bei bestimmten Kombinationen der Doppelmutanten war die Polysulfidbildung hingegen nicht eingeschränkt und vergleichbar mit SoxL (SoxL<sub>68,184</sub>, SoxL<sub>72,179</sub>, SoxL<sub>72,184</sub>). Besaßen die SoxL Varianten allerdings drei Cysteine, fiel die Menge der Polysulfide erneut sehr gering aus.

### 3.4.6 Strukturelle Analysen von SoxL mittels 1,5-I-AEDANS

Die Schwefelbindefähigkeit von SoxL sollte ebenfalls mit dem Reagenz 1,5-I-AEDANS nachgewiesen werden, wobei auch neue strukturelle Erkenntnisse über das Protein gewonnen wurden. Für diese Untersuchungen wurde SoxL zunächst mit 1,5-I-AEDANS inkubiert und es zeigte sich eine starke Bindung zwischen dem Reagenz und dem Protein, da unter UV-Belichtung die Proteinbanden stark fluoreszierten (**Abb. 3.28 A**; - S<sup>2-</sup>). Hierfür wurde ein Teil der Probe direkt auf eine SDS-Page aufgetragen und der andere Teil zunächst mit 7 mM DTT inkubiert. Hierbei zeigte sich, dass SoxL „isoliert“ (nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie) keinen Schwefel gebunden hatte, da das Reagenz mittels DTT nicht abgespalten werden konnte und somit die starke Fluoreszenz weiterhin bestand.

Bei vorheriger Sulfid-Vorbehandlung (SoxL wurde mit 10 mM Sulfid bei 30 °C für eine Stunde inkubiert und anschließend dialysiert, um überschüssiges Sulfid zu entfernen; daraus folgt SoxL „aktiviert“) zeigte sich wiederum, dass 1,5-I-AEDANS kaum am Protein binden konnte, da nur eine schwache Fluoreszenz erhalten wurde (**Abb. 3.28 A**; + S<sup>2-</sup>). SoxL interagiert anscheinend mit Sulfid, indem es zusätzlichen Schwefel aufnimmt und somit eine Konformationsänderung erfährt. Hierdurch werden die Cysteine für 1,5-I-AEDANS weniger zugänglich, wodurch eine Bindung des Reagenz am Protein fast ausbleibt. Die Bindung zwischen den Cysteinen und dem zusätzlich gebundenen Schwefel scheint weiterhin sehr stark zu sein, da eine nachfolgende DTT-Behandlung diesen, zusammen mit 1,5-I-AEDANS, nicht abspalten kann. Die Fluoreszenz müsste in diesem Fall noch weiter abnehmen bzw. nicht mehr vorhanden sein.

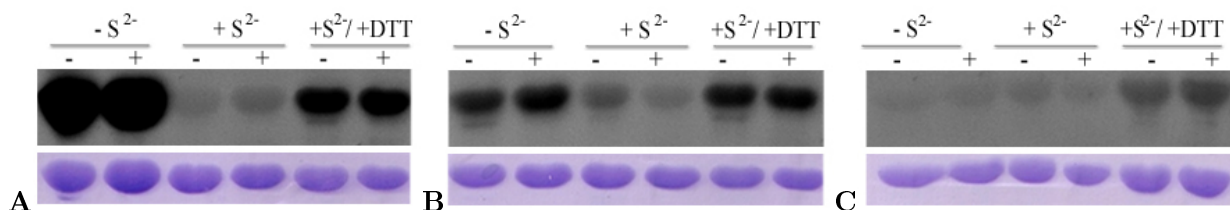


Abbildung 3.28: **Analyse der für 1,5-I-AEDANS zugänglichen Cysteine von SoxL (A), SoxL<sub>68,72,184</sub> (B) und SoxL<sub>68,72,179</sub> (C).** Jede Spur enthielt 10 µg Protein, welches mit 2 µM 1,5-I-AEDANS (4 °C, 1h) inkubiert wurde. Darauf folgte die Zugabe von 0,77 mM L-Cystein (30 min. bei RT), um überschüssiges 1,5-I-AEDANS zu entfernen. + / - gibt eine weitere Zugabe von 7 mM DTT (30 min. bei RT) nach 1,5-I-AEDANS Behandlung an. Die Proteine wurden auf eine denaturierende SDS-Page geladen. Das resultierende Gel bei UV-Belichtung (invertiert) ist im oberen Bild zu sehen. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie angefärbt (unteres Bild).

Zur Kontrolle wurde SoxL „aktiviert“ nochmals mit 10 mM DTT vorinkubiert und erst dann der 1,5-I-AEDANS Behandlung unterzogen. Hier zeigte sich, dass die Cysteine wieder zugänglich für das Reagenz waren, da eine erneut stärkere Fluoreszenz unter UV-Licht auftrat (**Abb. 3.28 A**; + S<sup>2-</sup> / + DTT).

Die gleichen Versuche wurden mit den SoxL Varianten SoxL<sub>68,72,184</sub> und SoxL<sub>68,72,179</sub> durchgeführt. SoxL<sub>68,72,184</sub> war zunächst in der Lage 1,5-I-AEDANS zu binden, da eine Fluoreszenz erhalten wurde. Diese Bindung fiel bei Sulfid-Vorbehandlung erneut schwächer aus (**Abb. 3.28 B**). Auch diese SoxL Variante scheint somit in Anwesenheit von Sulfid eine Konformationsänderung vorzunehmen, obwohl das Cys<sub>179</sub> gegen ein Serin ausgetauscht wurde. Ein anderes Ergebnis lieferte die SoxL Variante SoxL<sub>68,72,179</sub>. Hier konnte 1,5-I-AEDANS nicht mehr an das Protein binden. Dieser

Umstand änderte sich mit vorheriger Sulfidinkubation ebenfalls nicht. Erst bei Vorbehandlung mit DTT konnte die Bindung zwischen Reagenz und Protein verbessert werden, da eine etwas stärkere Fluoreszenz erhalten wurde (**Abb. 3.28 C**).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Sulfid die Konformation und somit die Zugänglichkeit der Cysteine für 1,5-I-AEDANS beeinflusst. Durch die Anwesenheit von vier Cysteinen scheint dieser Vorgang allerdings sehr komplex zu sein. Daher wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Claudia Domin alle SoxL Varianten dieser 1,5-I-AEDANS Behandlung unterzogen, um sich ein genaueres Bild dieser Vorgänge machen zu können. Hier wurde gezeigt, dass Cys<sub>68</sub> und Cys<sub>72</sub> eine Disulfid- oder Schwefelbrücke ausbilden, nachdem sie zusätzlichen Schwefel gebunden hatten. Cys<sub>184</sub> kann wiederum keinen zusätzlichen Schwefel aufnehmen, wodurch die Ergebnisse aus der Cyanolyse bestätigt wurden. Cys<sub>179</sub> ist strukturell unzugänglich für 1,5-I-AEDANS, da keine Bindung zum Reagenz erfolgte. Cys<sub>179</sub> und Cys<sub>184</sub> scheinen ebenfalls eine Disulfid- oder Schwefelbrücke miteinander auszubilden. Die oberen Ergebnisse (**Abb. 3.28**) sind folglich so zu erklären: Wenn alle Cysteine im Protein vorhanden sind, ist die Zugänglichkeit zu diesen gegeben („offene“ Konformation). Bei Fehlen von Cys<sub>179</sub> ändert sich dieser Umstand kaum. Wenn allerdings Cys<sub>184</sub> fehlt, sind ebenfalls Cys<sub>68</sub> und Cys<sub>72</sub> nicht mehr zugänglich. Cys<sub>179</sub> scheint also die „geschlossene“ Konformation zwischen Cys<sub>68</sub> und Cys<sub>72</sub> zu begünstigen, wenn Cys<sub>184</sub> nicht vorhanden ist. Diese Umstände ändern sich bei Vorhandensein von Sulfid. Nach Sulfid-Vorbehandlung scheinen Cys<sub>68</sub> und Cys<sub>72</sub> direkt eine Schwefelbrücke auszubilden. Auch Cys<sub>179</sub> und Cys<sub>184</sub> interagieren auf diese Weise miteinander, wodurch die „geschlossene“ Konformation begünstigt wird. Fehlt Cys<sub>184</sub> müsste Cys<sub>179</sub> somit zugänglich werden. Dieser Umstand blieb jedoch aus, was darauf hindeutet, dass Cys<sub>179</sub> strukturell verdeckt ist. Dies ist für Cys<sub>184</sub> nicht der Fall, da die Bindung zum Reagenz erfolgen konnte.

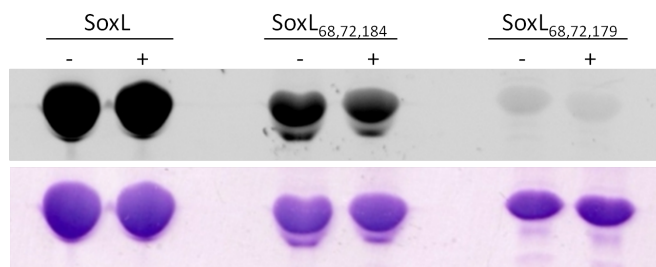


Abbildung 3.29: **Kontrollversuche zur Detektierung von überschüssigem Sulfid nach Dialyse.** SoxL-Lagerungspuffer (10 mM TrisHCl; pH 7,5) wurde mit 10 mM Sulfid versetzt und es folgte eine Inkubation bei 30 °C für eine Stunde. Anschließend wurden 10 µg Protein (SoxL, SoxL<sub>68,72,179</sub>, SoxL<sub>68,72,184</sub>) mit 25 µL von diesem Lagerungspuffer bei 30 °C für eine Stunde inkubiert. Danach erfolgte die 1,5-I-AEDANS Behandlung, der Lauf der SDS-Page und die Visualisierung der Proteine mittels UV-Licht (oberes Bild; invertiert) bzw. Coomassie-Färbung (unteres Bild). + / - gibt eine Zugabe von DTT nach 1,5-I-AEDANS Behandlung und vor SDS-Page Lauf an.

In einem weiteren Kontrollversuch sollte bestätigt werden, dass die erhaltenen Ergebnisse rein auf die Interaktion zwischen den Cysteinen beruhen. Hierfür wurde SoxL-Lagerungspuffer (10 mM Tris-HCl; pH 7,5) mit Sulfid inkubiert und einer Dialyse unterzogen. SoxL, als auch SoxL<sub>68,72,179</sub> und SoxL<sub>68,72,184</sub>, wurden anschließend mit diesem Puffer inkubiert und danach einer 1,5-I-AEDANS Behandlung unterzogen. Für alle Proteine wurden die gleichen Fluoreszenzen (**Abb. 3.29**) erhalten, wie bei den vorherigen Experimenten vor Sulfidinkubation. Somit konnte bestätigt werden,

dass sich nach der Dialyse kein Sulfid mehr in den Proben befand, dass mit 1,5-I-AEDANS hätte reagieren können.

Folglich wurde gezeigt, dass SoxL Schwefel aufnehmen und Disulfid- oder Schwefelbrücken zwischen den jeweiligen Cysteinen ausbilden kann. Diese Ergebnisse wurden erhalten, indem die Versuche in Anwesenheit von Sauerstoff durchgeführt wurden. Da die Schwefeloxidation in *Alc. vinosum* aber unter anaeroben Bedingungen stattfindet, sollte weiterhin untersucht werden, ob die Ausbildung der Brücken auch unter anaeroben Bedingungen stattfindet. Hierfür wurde die Sulfidinkubation und anschließende 1,5-I-ADAENS Behandlung in einem Anaerobenzelt durchgeführt. Es zeigte sich, dass SoxL auch unter anaeroben Bedingungen Schwefel aufnehmen und Disulfid- oder Schwefelbrücken ausbilden kann, da 1,5-I-AEDANS nicht in der Lage war am persulfurierten SoxL zu binden und eine Fluoreszenz ausblieb (**Abb. 3.30**).

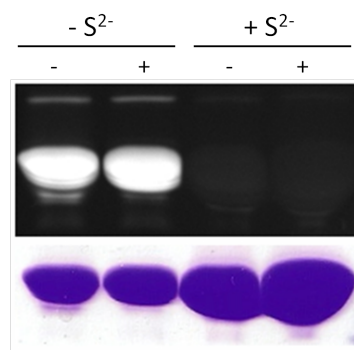


Abbildung 3.30: **1,5-I-ADAENS Behandlung von SoxL unter anaeroben Bedingungen.** Schritte im Anaerobenzelt: SoxL wurde mit 10 mM Sulfid inkubiert (30 °C; 1 h) und anschließend dialysiert (5x 1L 10 mM TrisHCl (pH 7,5)). Die Proben wurden anschließend einer 1,5-I-AEDANS Behandlung unterzogen. Schritte außerhalb des Zeltes: Alle Proteine wurden anschließend auf eine nicht-denaturierende SDS-Page (15 %ig) geladen und mittels UV-Licht (oberes Bild) bzw. Coomassie-Färbung (unteres Bild) visualisiert. + / - gibt eine Zugabe von DTT nach 1,5-I-AEDANS Behandlung und vor SDS-Page Lauf an.

### 3.5 Der Einfluss von SoxL auf das Sox System

Wie bereits beschrieben, ist das Gen *soxL* Teil des Genclusters *soxXAKL* und besitzt einen positiven Einfluss auf die Thiosulfatoxidationsrate des Sox Systems. Es wurde vermutet, dass SoxL in der Lage sein könnte, den Sulfanschwefel von SoxYZ aufzunehmen und weiter an die Schwefelkugelproteine zu transferieren. Somit könnte letztlich der Zyklus der Thiosulfatoxidation geschlossen werden, da *Alc. vinosum* nicht über den Proteinkomplex SoxCD verfügt, welcher für die Regenerierung von SoxYZ in *P. pantotrophus* verantwortlich ist. Die Interaktion und ein möglicher Schwefeltransfer zwischen SoxYZ und SoxL wurde folglich untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss von SoxL und den SoxL Varianten auf das Sox System mit rekombinanten Sox-Proteinen, ausschließlich aus *Alc. vinosum*, überprüft.



### 3.5.1 Interaktionsstudien von SoxL und SoxYZ

Zunächst sollte die Interaktion zwischen SoxL und SoxYZ mittels Co-Präzipitations-Analysen nachgewiesen werden. Dafür wurde ein rekombinantes SoxYZ mit angehängtem Strep-Tag hergestellt und mittels StrepTactin®-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Das Gen *soxYZ* wurde zuvor ohne die Nukleotidsequenz, kodierend für das Signalpeptid, amplifiziert und über die eingefügten Schnittstellen *EcoRI* und *NcoI* in das Plasmid pASK-3 kloniert. Das rekombinante SoxYZ wurde nach StrepTactin®-Affinitätschromatographie erhalten, entsalzt und im Stabilisierungspuffer gelagert (Abb. 3.31).

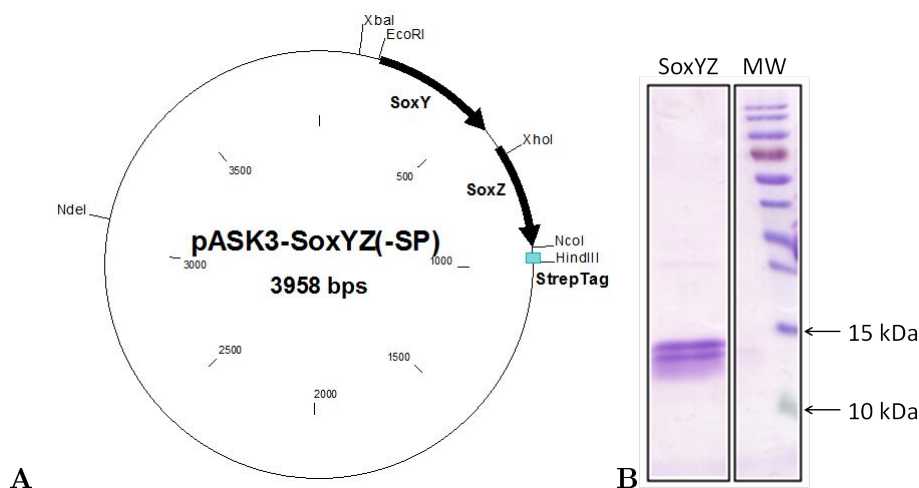


Abbildung 3.31: **Das konstruierte Überexpressionsplasmid pASK3-SoxYZ(-SP) (A) und die SDS-Page Analyse der durchgeführten Aufreinigung von SoxYZ mittels Streptactin-Affinitätschromatographie (B).** **A** Amplifiziertes SoxYZ wurde über die eingefügten Schnittstellen *EcoRI* und *NcoI* in das Plasmid pASK3 kloniert. **B** Rekombinantes SoxYZ wurde mittels Streptactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Elutionsfraktionen mit vorhandenem SoxYZ wurden vereinigt und via HighTrap-Säule gegen Stabilisierungspuffer (25 mM KPP-Puffer, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; pH 6,5) entsalzt. 2 µg Protein wurden auf eine 15%ige SDS-Page aufgetragen und mit Coomassie gefärbt.

Für die Co-Präzipitations-Analysen wurden 120 µg SoxYZ (+StrepTag) und 400 µg SoxL (+HisTag) zusammen gegeben und gemeinsam bei 30 °C für eine Stunde inkubiert (Kontrollprobe: Inkubation von 400 µg SoxL bei 30 °C für eine Stunde). Anschließend wurden die Co-Präzipitations-Proben (SoxYZ+SoxL) und die Kontrollprobe auf zwei getrennte StrepTactin®-Säulen (je 0,5 mL) gegeben. Die Säulen wurden gewaschen und die Proteine mittels Elutionspuffer von der Säule gelöst. Alle Fraktionen (Durchlauf-, und Waschfraktion) wurden aufbewahrt und die Elutionsfraktionen mit einer VivaSpin®-Säule (Sartorius) aufkonzentriert. Proteine aller Fraktionen wurden auf einer 15%igen SDS-Page aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Detektierung von SoxL erfolgte über spezifische HisTag-Antikörper.

Bei dem Kontrollansatz war SoxL in der Durchlauf- sowie in der Waschfraktion enthalten. Ein geringer Anteil konnte in der ersten Elutionsfraktion (E1) detektiert werden. Im Gegensatz dazu, befand sich SoxL in einem höheren Maße, zusammen mit SoxYZ, in beiden Elutionsfraktionen des Interaktionsansatzes. Dies ist sowohl beim Immunoblot, als auch in der Coomassie-Färbung ersichtlich (Abb. 3.32). SoxYZ und SoxL scheinen eine Bindung einzugehen, da beide Proteine

zusammen von der StrepTactin®-Säule eluiert wurden.

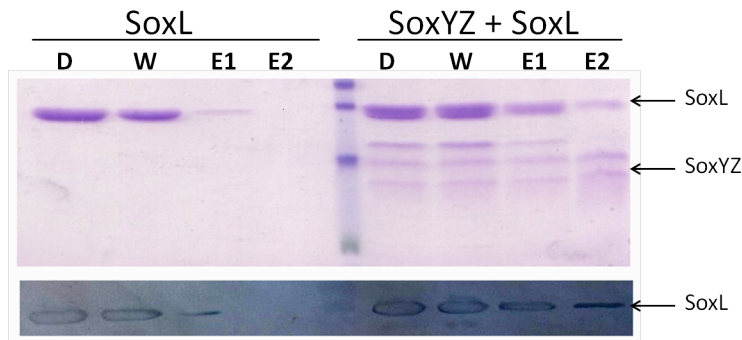


Abbildung 3.32: **Co-Präzipitations-Analysen von SoxYZ (+StrepTag) und SoxL (+HisTag)**. 120 µg SoxYZ (+StrepTag) und 400 µg SoxL (+HisTag) wurden bei 30 °C für eine Stunde vorinkubiert. Gleichzeitig wurde eine Kontrollprobe hergestellt (Inkubation von 400 µg SoxL bei 30 °C für eine Stunde). Danach wurden beide Ansätze auf eine StrepTactin®-Säule (je 0,5 mL) gegeben. Die Durchlauf-Fraktion (D) wurde aufbewahrt. Darauf folgte der Waschvorgang (2 x 500 µL PufferW). Beide Waschfraktionen (W) wurden vereinigt und ebenfalls aufbewahrt. Die Elution erfolgte mit 5 x 200 µL PufferE. Die Elutionsfraktionen 1-2 (E1) sowie die Elutionsfraktionen 3-5 (E2) wurden vereinigt und mittels VivaSpin®-Säule aufkonzentriert. 25 µL Protein jeder Fraktion wurden auf eine denaturierende SDS-Page (15%ig) aufgetragen. Anschließend erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran und die Detektierung von SoxL mittels HisTag-spezifischem Antikörper (unteres Bild). Nicht übertragene Proteine wurden danach mit Coomassie angefärbt (oberes Bild).

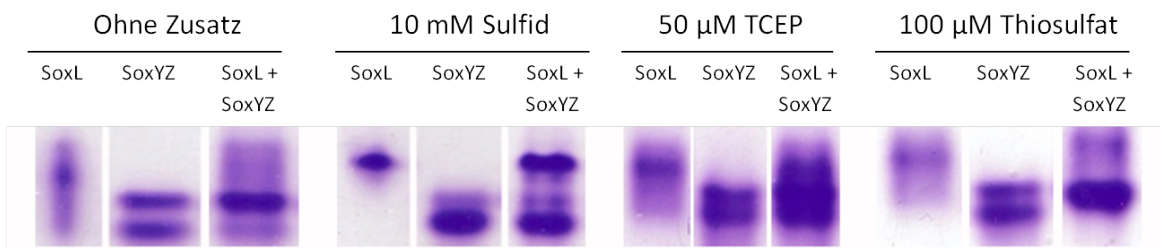


Abbildung 3.33: **Interaktionsstudien zwischen SoxYZ und SoxL im nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel**. 200 pmol SoxL und 300 pmol SoxYZ wurden unter variiierenden Bedingungen (kein Zusatz; 10 mM Sulfid; 50 µM TCEP; 100 µM Thiosulfat) für 1 Stunde bei 30 °C miteinander inkubiert (50 mM BisTris Puffer; pH 6,8). Die einzelnen Proben wurden auf ein 7,5%iges natives Gel gegeben und der Lauf fand bei 4 °C statt. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie gefärbt.

Die Interaktion zwischen SoxL und SoxYZ konnte ferner mittels nichtdenaturierendem Polyacrylamidgel nachgewiesen werden. Hierfür wurden 200 pmol SoxL und 300 pmol SoxYZ unter variiierenden Bedingungen für 1 Stunde bei 30 °C miteinander in 50 mM BisTris Puffer (pH 6,8) inkubiert. Die Proben enthielten neben den Proteinen 10 mM Sulfid, 50 µM TCEP, 100 µM Thiosulfat bzw. keinen Zusatz. Die einzelnen Proben wurden auf ein 7,5%iges natives Gel gegeben und der Lauf fand bei 4 °C statt. Nach anschließender Coomassie-Färbung wurde deutlich, dass SoxYZ erneut als zwei Banden auftauchte, welche die heterodimere bzw. heterotetramere Form des Proteinkomplexes darstellen. In Anwesenheit von SoxL ergab sich eine deutliche Bandenverlagerung von SoxYZ zur

heterotetrameren Form, da hauptsächlich die obere Bande erhalten wurde und die untere nur noch schwach ausgeprägt war. Die gleichen Ergebnisse konnten mit 100  $\mu\text{M}$  Thiosulfat, aber nicht mit Sulfid oder TCEP, erhalten werden (**Abb. 3.33**). Sulfid schien SoxYZ zur heterodimeren Form zu reduzieren, wobei SoxL hier keinen weiteren Einfluss zu haben scheint. Das Reduktionsmittel TCEP zeigte wiederum keine Wirkung auf SoxYZ oder SoxL.

### 3.5.2 Schwefeltransfer von SoxYZ zu SoxL

Mittels 1,5-I-ADAENS sollte ein Schwefeltransfer von SoxYZ zu SoxL nachgewiesen werden. Hierzu wurde SoxYZ, wie zuvor beschrieben, mit Sulfid „aktiviert“ und anschließend mit SoxL inkubiert. Ein weiterer Ansatz bestand aus SoxYZ „isoliert“ (keine vorherige Sulfidinkubation) und SoxL.

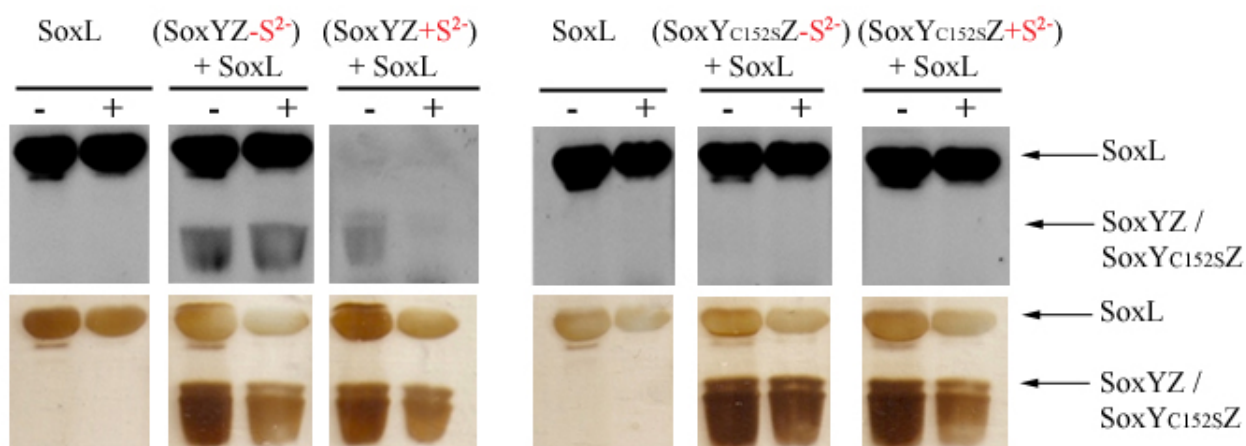


Abbildung 3.34: **Schwefeltransfer-Analyse zwischen SoxYZ und SoxL mittels 1,5-I-ADAENS.** SoxL und SoxL-SoxYZ / SoxL - SoxY<sub>C152S</sub>Z Ansätze wurden mit 2  $\mu\text{M}$  1,5-I-ADAENS (4 °C, 1h) inkubiert. Es folgte die Zugabe von 0,77 mM L-Cystein (30 min at RT), um überschüssiges 1,5-I-AEDANS zu entfernen. + / - gibt eine weitere Zugabe von 7 mM DTT (30 min. bei RT) nach der 1,5-I-AEDANS Behandlung an. Die Proteine wurden auf eine denaturierende SDS-Page aufgetragen. Fluoreszierende Proteinbanden wurden mittels UV-Belichtung sichtbar gemacht (oberes Bild; invertiert). Anschließend wurden die Proteine mit Silberfärbung behandelt (unteres Bild). Die Persulfurierung von SoxYZ wurde durch eine Inkubation des Proteinkomplexes mit 10 mM Sulfid (30 °C, 1h) und anschließender Dialyse erreicht.

Unter UV-Belichtung konnte eine deutliche Verminderung der SoxL-Fluoreszenz ausgemacht werden, wenn dieses zuvor mit aktiviertem SoxYZ inkubiert wurde. Diese Fluoreszenzverminderung gleicht jener, welche durch direkte Sulfidinkubation von SoxL entstand (**Abb. 3.34**; links). Die gleichen Versuche wurden mit dem mutierten SoxY<sub>C152S</sub> durchgeführt, bei dem ein Schwefeltransfer zu SoxL ausblieb (**Abb. 3.34**; rechts). Hiermit konnte bestätigt werden, dass SoxYZ in der Lage ist zuvor gebundenen Schwefel an SoxL zu transferieren.

### 3.5.3 Vollständige Rekonstitution des Sox Systems mit SoxL und SoxL-Varianten

SoxL wurde ebenfalls in die Sox Assays eingesetzt, um einen möglichen Einfluss des Proteins auf das gesamte Sox System zu untersuchen. Hierbei stand eine mögliche Interaktion zwischen SoxYZ und SoxL im Fokus. Deswegen wurden die einzelnen, zuvor isolierten Formen von SoxYZ (Heterodimer, Heterotetramer) im Zusammenhang mit dem aufgereinigten SoxL (SoxL „isoliert“) und mit Sulfid-behandeltem SoxL (SoxL „aktiviert“) näher untersucht.

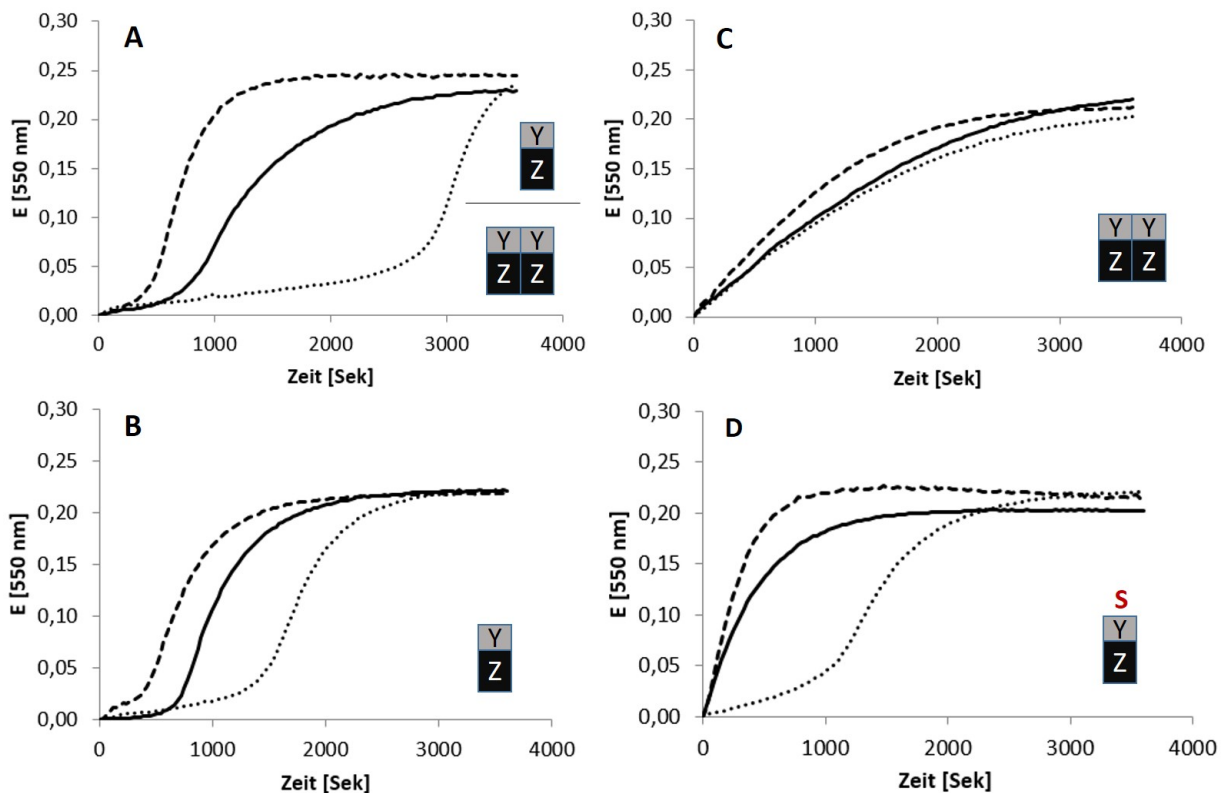


Abbildung 3.35: **Enzymatischer Verlauf des rekonstituierten Sox-Systems in Anwesenheit von SoxL und unterschiedlichen SoxYZ-Fractionen.** Reaktionsansätze enthielten 1  $\mu\text{M}$  SoxYZ, 1  $\mu\text{M}$  SoxL, 0,05  $\mu\text{M}$  SoxXB, 0,25  $\mu\text{M}$  SoxXAK, 35  $\mu\text{M}$  Cytochrom c, 100  $\mu\text{M}$  Thiosulfat bei einem pH von 6,8. Die Cytochrom c Reduktion wurde durch die Erhöhung der Absorption bei 550 nm aufgenommen. Die Assays wurden mit 1  $\mu\text{M}$  SoxYZ (**durchgehende Linie**) bzw. in Anwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  SoxL „aktiviert“ (**gestrichelte Linie**) oder 1  $\mu\text{M}$  SoxL „isoliert“ (**gepunktete Linie**) durchgeführt. Die Aktivierung von SoxL wurde durch eine Inkubation mit 10 mM Sulfid (30 °C, 1h) und anschließender Dialyse erreicht. **A:** SoxYZ „isoliert“; Heterotetramer sowie Heterodimer vorhanden. **B:** SoxYZ als Heterodimer vorhanden. **C:** SoxYZ als Heterotetramer vorhanden. **D:** SoxYZ als Heterodimer, welches durch Sulfid aktiviert wurde. Die einzelnen SoxYZ Fractionen stammen aus der Aufreinigung mittels Gelfiltrationschromatographie.

Bei Zuführung von SoxL „isoliert“ in das Sox System zeigte sich eine zusätzliche Verlängerung der enzymatischen Initialphase („lag“-Phase), bevor das System seine erhöhte Aktivitätsphase erreichen konnte (**Abb. 3.35 A**; gepunktete Linie). Hier wurde SoxYZ „isoliert“ eingesetzt. Diese Probe enthielt nachgewiesenermaßen sowohl die heterodimere, als auch die heterotetramere SoxYZ-Form. Die „lag“-Phase betrug ca. 45 Minuten. Diese konnte auf 8 Minuten verkürzt werden, indem SoxL „aktiviert“ in das Sox Assay eingesetzt wurde (**Abb. 3.35 A**; gestrichelte Linie). Ohne Vorhandensein

von SoxL betrug diese „lag“-Phase bereits ca. 14,5 Minuten (**Abb. 3.35 A**; durchgehende Linie). SoxL war also in der Lage, die Initialphase zu verkürzen, wenn es sich selber in einem aktivierten Zustand befand. Es verlängerte aber diese „lag“-Phase deutlich, wenn es direkt nach der Aufreinigung in das Sox System hinzugefügt wurde.

Weiterhin konnte durch das Vorhandensein von SoxL „isoliert“ sowie von SoxL „aktiviert“ die Aktivität der Aktivitätsphase deutlich gesteigert werden. Ohne SoxL betrug diese 15,9 m( $\Delta E$ /min). Mit SoxL „isoliert“ betrug sie 22,8 m( $\Delta E$ /min) und konnte mit SoxL „aktiviert“ weiter auf 29,4 m( $\Delta E$ /min) gesteigert werden (**Tabelle 3.19**).

Tabelle 3.19: **Spezifische Aktivitäten des Sox Systems mit SoxL „isoliert“, SoxL „aktiviert“ und unterschiedlichen SoxYZ Fraktionen.** SoxL [+]: SoxL wurde aktiviert. SoxL [-]: SoxL „isoliert“

SoxL +/-	Spez. Aktivität [m( $\Delta E$ /min)]	„lag“-Phase [min]
<b>Ergebnisse mit SoxYZ „isoliert“</b>		
(SoxYZ) / (SoxYZ) <sub>2</sub>	15,9	14,5
SoxL [-]	22,8	48,5
SoxL [+]	29,4	8,0
<b>Ergebnisse mit heterotetramerer SoxYZ Form</b>		
(SoxYZ) <sub>2</sub>	7,8	0
SoxL [-]	6,8	0
SoxL [+]	12,1	0
<b>Ergebnisse mit heterodimerer SoxYZ Form</b>		
(SoxYZ)	17,6	12,0
SoxL [-]	21,0	25,5
SoxL [+]	21,0	7,5
<b>Ergebnisse mit aktivierter heterodimer SoxYZ Form<sup>1</sup></b>		
(SoxYZ)	23,8	0
SoxL [-]	14,2	19,0
SoxL [+]	36,6	0
<b>Ergebnisse mit aktivierter heterodimer SoxYZ Form<sup>2</sup></b>		
(SoxYZ)	22,2	0
SoxL [-]	24,0	20,0
SoxL [+]	36,6	0

<sup>1</sup>SoxYZ wurde über Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt und anschließend mittels Sulfidbehandlung aktiviert.

<sup>2</sup>SoxYZ wurde mittels Sulfidbehandlung aktiviert und anschließend über Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt.

Ähnliche Ergebnisse konnte mit dem Zusatz der reinen heterodimeren Form von SoxYZ erhalten werden. Auch hier wurde die „lag“-Phase durch SoxL „isoliert“ verlängert und das Beisein von SoxL „aktiviert“ führte zu einer Erhöhung der generellen Aktivität des Systems (**Abb. 3.35 B**). Die Beeinflussung fiel allerdings nicht so stark aus, wie mit SoxYZ „isoliert“.

Bei Zuführung der reinen heterotetrameren Form von SoxYZ zeigte SoxL „isoliert“ keinerlei Beeinflussung auf das Sox System, da eine „lag“-Phase ausblieb. Die generelle Aktivität war niedriger, als bei den anderen eingesetzten Formen von SoxYZ und konnte durch Vorhandensein von SoxL „aktiviert“ nur geringfügig gesteigert werden (**Abb. 3.35 C, Tabelle 3.19**). SoxL scheint also auf die heterotetramere SoxYZ-Form keinen oder kaum einen Einfluss zu haben.

Befand sich SoxYZ im aktivierten Zustand und somit in der heterodimeren Form, konnte durch SoxL „aktiviert“ eine weitere Aktivitätssteigerung erzielt werden. Mit diesen Modifizierungen wurde die höchste Aktivität von 36,6 m( $\Delta E$ /min) erhalten. Eine „lag“-Phase zeigte sich auch hier, wenn SoxL „isoliert“ zu dem System beigefügt wurde, welche allerdings nur ca. 20 Minuten betrug (**Abb. 3.35 D, Tabelle 3.19**). Die gleichen Aktivitäten bzw. „lag“-Phasen zeigten sich mit aktiviertem SoxYZ aus unterschiedlichen Behandlungen. Somit machte es keinen Unterschied, ob SoxYZ nach oder vor der Gelfiltrationschromatographie mit Sulfid behandelt wurde (**Tabelle 3.19**). Bei Letzterem war es allerdings wichtig, dass SoxYZ nochmals mittels Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt wurde, damit es sich in der rein heterodimeren Form befand.

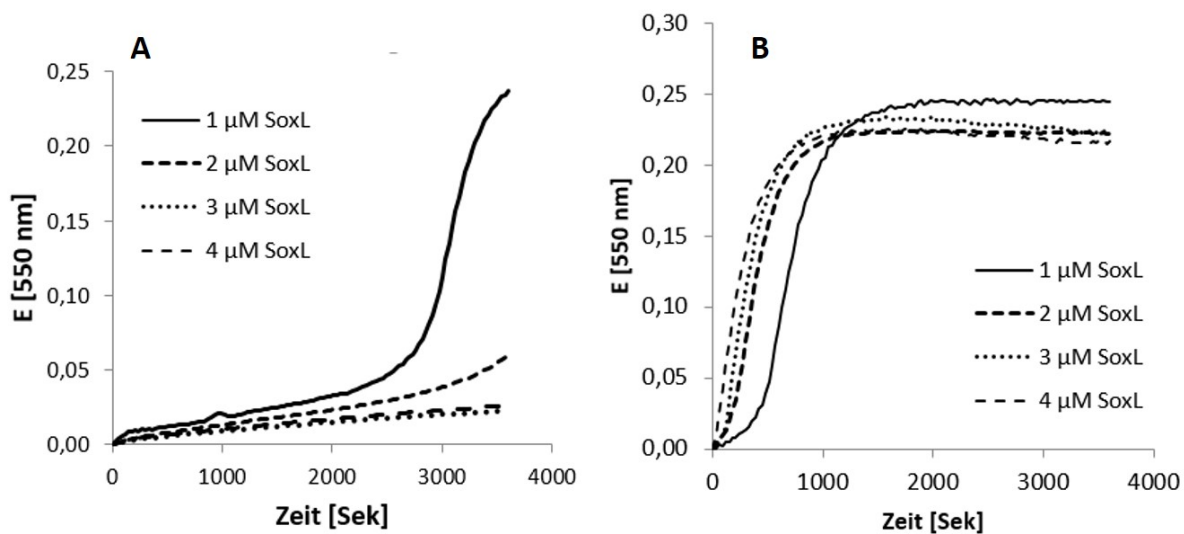


Abbildung 3.36: **Enzymatischer Verlauf des rekonstituierten Sox-Systems in Anwesenheit von unterschiedlichen SoxL-Konzentrationen.** Reaktionsansätze enthielten 1 µM SoxYZ, 1 µM SoxL bzw. 2 µM, 3 µM und 4 µM SoxL, 0,05 µM SoxB, 0,25 µM SoxXAK, 35 µM Cytochrom c, 100 µM Thiosulfat bei einem pH von 6,8. Die Cytochrome c Reduktion wurde durch die Erhöhung der Absorption bei 550 nm aufgenommen. **A:** Zugabe von aufgereinigtem SoxL (SoxL „isoliert“). **B:** Zugabe von aktiviertem SoxL (SoxL „aktiviert“). Die Aktivierung von SoxL wurde durch eine Inkubation mit 10 mM Sulfid (30 °C, 1h) und anschließender Dialyse erreicht.

Um den Einfluss von SoxL auf das Sox System zu verdeutlichen, wurden unterschiedliche Konzentrationen von SoxL „isoliert“ sowie SoxL „aktiviert“ dem Sox System zugesetzt. Dabei zeigte sich, dass höhere Konzentrationen von SoxL „isoliert“ die Initialphase („lag“-Phase) weiter verlängerte (**Abb. 3.36 A**). Im Gegensatz dazu, verkürzten höhere Konzentrationen von SoxL „aktiviert“ diese

„lag“-Phase. Mit 4  $\mu\text{M}$  SoxL „aktiviert“ konnte die „lag“-Phase fast vollständig aufgehoben und eine Aktivität von 36,5  $\text{m}(\Delta\text{E}/\text{min})$  gemessen werden (Abb. 3.36 B; Tabelle 3.20).

Tabelle 3.20: **Spezifische Aktivitäten des Sox Systems mit unterschiedlichen Konzentrationen von SoxL „aktiviert“**.

SoxL	Spez. Aktivität [ $\text{m}(\Delta\text{E}/\text{min})$ ]	„lag“-Phase [min]
1 $\mu\text{M}$	29,4	8,5
2 $\mu\text{M}$	30,8	4,0
3 $\mu\text{M}$	36,6	2,0
4 $\mu\text{M}$	36,5	0,5

Die gleichen Sox-System Assays wurden weiterhin mit allen hergestellten SoxL-Varianten durchgeführt, um den genauen Mechanismus zu analysieren, inwiefern SoxL in der Lage sein könnte, SoxYZ bzw. den Aktivitätsverlauf des Sox-System zu beeinflussen (Abb. 3.37).

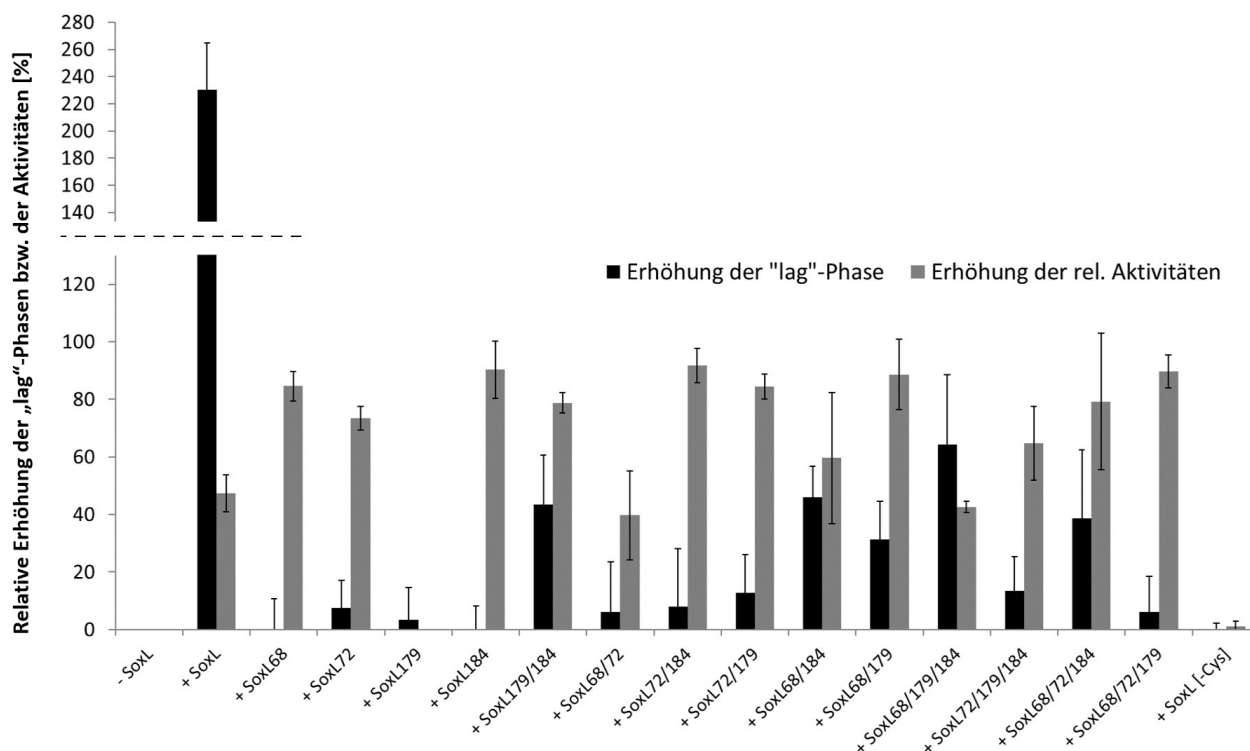


Abbildung 3.37: **Beeinflussung des Sox Systems in Anwesenheit der einzelnen SoxL Mutanten im inaktivierten Zustand.** Die Reaktionsverläufe des Sox Systems wurden, wie oben beschrieben, gemessen. Jeder Reaktionsansatz beinhaltet 1  $\mu\text{M}$  einer bestimmten SoxL Mutante. Für die Auswertung der „lag“-Phase wurde die Länge der Initialphase ohne SoxL (-SoxL) als Standard gewählt (14,5 min. entsprechen 0 %; weitere 14,5 min. entsprechen folglich 100 % usw.). Die prozentualen Angaben weisen eine relative Erhöhung dieser Initialphasen in Anwesenheit der einzelnen SoxL Mutanten auf. Für die Auswertung der relativen Aktivitäten wurde ebenfalls die relative Aktivität mit SoxYZ im Sox System allein als Standard gesetzt (15,9 [ $\text{m}(\Delta\text{E}/\text{min})$ ]) entspricht 0 %). Alle prozentualen Angaben zeigen eine Erhöhung der relativen Aktivitäten in Anwesenheit der aufgezeigten SoxL Mutante.

Hierbei zeigte sich, dass nur SoxL mit allen vier vorhandenen Cysteinen in der Lage war, die Initialphase („lag“-Phase) auf ungefähr 45 Minuten zu verlängern. Mit Zufuhr der anderen SoxL-Varianten wurden deutlich geringere „lag“-Phasen erhalten, wobei sie nach wie vor die ursprüngliche Initialphase des Sox Systems (- SoxL; + SoxYZ „isoliert“) verlängerten (**Abb. 3.37**; schwarze Balken).

Hierzu gehörte die SoxL-Variante SoxL<sub>179/184</sub>, deren Carboxy-terminales Cysteinpaar vorlag. Vor allem das Vorhandensein von Cys<sub>68</sub> schien eine Verlängerung der „lag“-Phase zu begünstigen, da SoxL<sub>68/184</sub>, SoxL<sub>68/179</sub>, SoxL<sub>68/179/184</sub> und SoxL<sub>68/72/184</sub> eine Verlängerung um ca. 40 % verursachten. Diese Tendenz lag jedoch nicht für SoxL<sub>68</sub>, SoxL<sub>68,72</sub> und SoxL<sub>68,72,179</sub> vor. Hier vermag Cys<sub>68</sub> scheinbar nicht allein diese Funktion übernehmen zu können und wird weiterhin durch Cys<sub>72</sub> daran gehindert. Zusätzlich war auffällig, dass die SoxL Mutanten mit jeweils nur einem funktionellen Cystein kaum oder gar nicht mehr in der Lage waren, die „lag“-Phase zu erhöhen. Dies wurde durch das Vorhandensein von SoxL-Cys bekräftigt, da auch hier keine „lag“-Phasen-Erhöhung erhalten wurde.

Wenn man die relativen Aktivitäten in der Aktivitätsphase betrachtet, konnten viele SoxL-Varianten diese deutlich erhöhen. Hierzu gehörten ebenfalls die SoxL-Varianten mit jeweils nur einem Cystein. Die Ausnahme bildete hierbei SoxL<sub>179</sub>, dessen Zufuhr in das Sox System keinerlei Steigerung der relativen Aktivität erzielen konnte. Die gleichen Ergebnisse wurden mit SoxL-Cys erhalten (**Abb. 3.37**; graue Balken). Im Weiteren wurden die SoxL Mutanten mit Sulfid aktiviert und dem Sox System zugesetzt (**Abb. 3.38**).

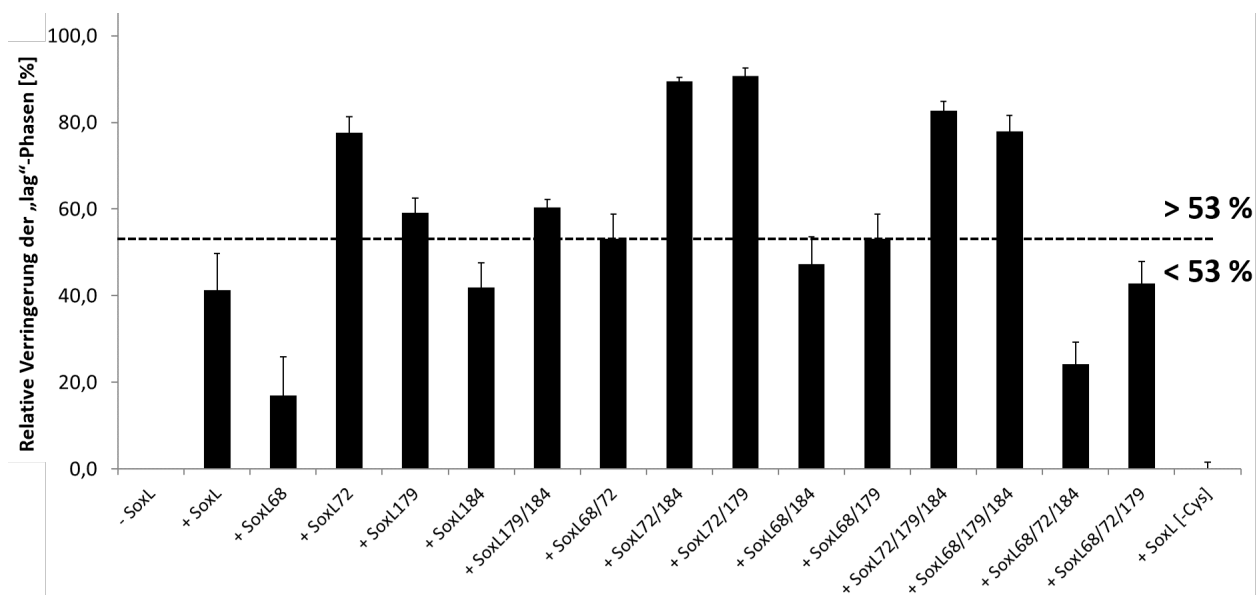


Abbildung 3.38: **Beeinflussung der „lag“-Phasen des Sox Systems in Anwesenheit der einzelnen SoxL Mutanten im aktivierten Zustand.** Die Reaktionsverläufe des Sox Systems wurden, wie oben beschrieben, gemessen. Jeder Reaktionsansatz beinhaltet 1  $\mu$ M einer bestimmten SoxL Mutante, welche zuvor aktiviert wurden. Die Aktivierung von SoxL wurde durch eine Inkubation mit 10 mM Sulfid (30 °C, 1h) und anschließender Dialyse erreicht. Für die Auswertung der „lag“-Phase wurde die Länge der Initialphase ohne SoxL (-SoxL) als Standard gewählt (14,2 min. entsprechen 0 %). Die prozentualen Angaben weisen eine relative Erniedrigung dieser Initialphasen in Anwesenheit der einzelnen SoxL Mutanten auf.



Hierbei zeigte sich, dass alle SoxL Mutanten, außer SoxL<sub>Cys</sub>, in der Lage waren die „lag“-Phase des Sox Systems (- SoxL; + SoxYZ „isoliert“) zu verringern. Trotz dieser gemeinsamen Eigenschaft zeigten sich hier einige Unterschiede in der Intensität dieser Verringerung. Eine Reduzierung von über 60 % erzielten vor allem die SoxL Mutanten, welche das Carboxyl-terminale Cysteinpaar Cys<sub>179/184</sub> besaßen. Ebenfalls verstärkte das Vorhandensein von Cys<sub>72</sub> eine weitere Verringerung der „lag“-Phasen. Im Gegensatz dazu wurden geringere Reduzierungen (unter 53 %) erzielt, wenn das N-terminale Cysteinpaar Cys<sub>68/72</sub> vorlag bzw. wenn Cys<sub>68</sub> zusammen mit anderen Cysteinen vorhanden war (**Abb. 3.38; Tabelle 3.21**).

Tabelle 3.21: **Übersicht der „lag“-Phasen und deren Verringerungen durch das Vorhandensein von aktivierten SoxL Mutanten im Sox System.**

Hohe Reduzierung der „lag“-Phase			Geringe Reduzierung der „lag“-Phase		
SoxL Mut.	„lag“-Phase [min]	Reduz. [%]	SoxL Mut.	„lag“-Phase [min]	Reduz. [%]
- SoxL	14,2	0			
			SoxL <sub>68</sub>	11,8	17 (+/- 8,9)
SoxL <sub>72</sub>	3,2	77 (+/-3,6)	SoxL <sub>184</sub>	8,3	42 (+/- 5,7)
SoxL <sub>72/179</sub>	1,3	90 (+/-1,9)	SoxL <sub>68/72</sub>	6,7	53 (+/- 5,7)
SoxL <sub>72/184</sub>	1,5	89 (+/-1,0)	SoxL <sub>68/184</sub>	7,5	47 (+/- 6,2)
SoxL <sub>72/179/184</sub>	2,5	82 (+/- 2,2)	SoxL <sub>68/179</sub>	6,7	53 (+/- 5,7)
SoxL <sub>68/179/184</sub>	3,2	77 (+/- 3,7)	SoxL <sub>68/72/184</sub>	10,8	24 (+/- 5,0)
SoxL <sub>179</sub>	5,8	59 (+/- 3,5)	SoxL <sub>68/72/179</sub>	8,2	43 (+/- 5,1)
SoxL <sub>179/184</sub>	5,7	60 (+/- 1,9)	SoxL <sub>[-Cys]</sub>	16,3	-15 (+/- 16,7)
			SoxL	8,3	41,4 (+/-8,4)

Betrachtet man die relativen Aktivitäten in der Aktivitätsphase zeigt sich, dass ebenfalls alle SoxL Mutanten (außer SoxL<sub>[-Cys]</sub>) in der Lage waren, diese zu erhöhen, wobei auch hier Unterschiede in der Intensität vorlagen (**Abb. 3.39; Tabelle 3.22**). Generell ist ersichtlich, dass die Aktivitäten höher ausfallen, je weniger Cysteine die SoxL Mutanten vorweisen. So erzielten SoxL<sub>68</sub>, SoxL<sub>72</sub>, und SoxL<sub>184</sub> Aktivitätserhöhungen von über 70 %. Nur mit SoxL<sub>179</sub> fiel die Aktivitätserhöhung mit 53 % geringer aus. Aktivitätserhöhungen um die 40 % wurden weiterhin mit allen SoxL Mutanten erhalten, in denen 3 Cysteine vorlagen. Die niedrigste Aktivitätserhöhung mit 33 % lag vor, wenn SoxL<sub>68/72</sub> dem Sox System zugesetzt wurde. Fast alle anderen Doppelmутanten erzielten dagegen Aktivitätserhöhungen um die 50 %. Mit dem unveränderten und aktiviertem SoxL erhielt man dagegen eine Aktivitätssteigerung von 85 %.

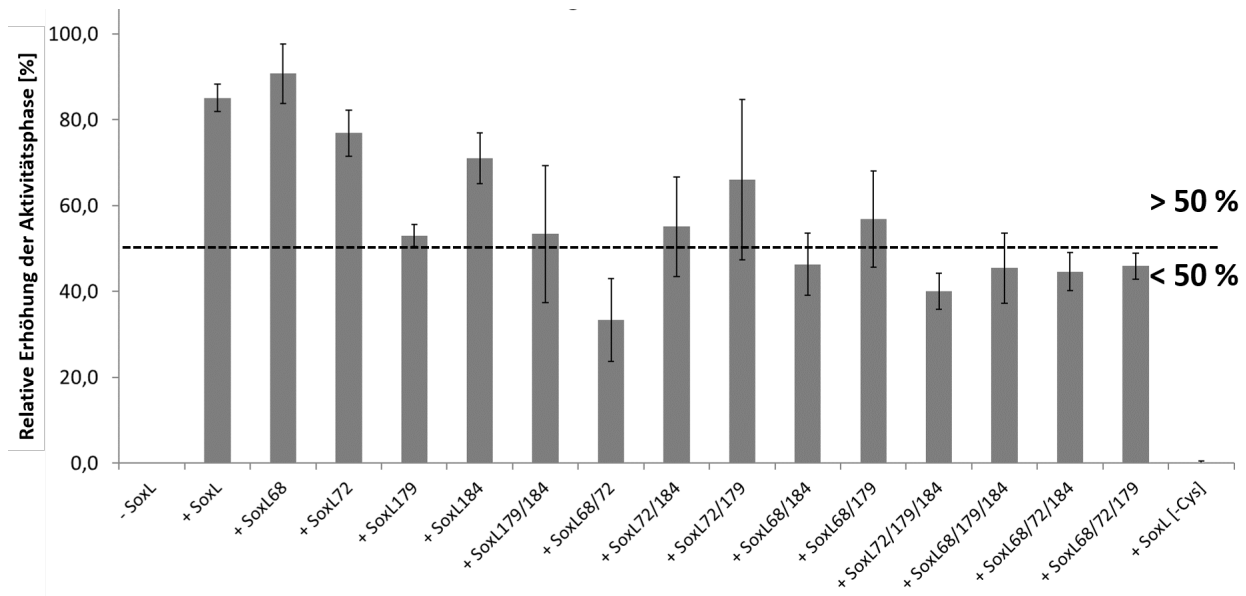


Abbildung 3.39: **Beeinflussung der Aktivitäten des Sox Systems in Anwesenheit der einzelnen SoxL Mutanten im aktivierten Zustand.** Die Reaktionsverläufe des Sox Systems wurden, wie oben beschrieben, gemessen. Jeder Reaktionsansatz beinhaltete 1  $\mu\text{M}$  einer bestimmten SoxL Mutante, welche zuvor aktiviert wurden. Die Aktivierung von SoxL wurde durch eine Inkubation mit 10 mM Sulfid (30 °C, 1h) und anschließender Dialyse erreicht. Für die Auswertung der Aktivitäten wurde die Aktivität ohne SoxL (-SoxL) als Standard gewählt (15,9 [ $\text{m}(\Delta\text{E}/\text{min})$ ] entspricht 0%). Die prozentualen Angaben weisen eine relative Erhöhung der Aktivitäten in Anwesenheit der einzelnen SoxL Mutanten auf.

Tabelle 3.22: **Übersicht der Aktivitäten und dessen Erhöhung durch das Vorhandensein von aktivierten SoxL Mutanten im Sox System.**

Hohe Aktivitäten			Niedrige Aktivitäten		
SoxL Mut.	rel. Aktiv. [ $\text{m}(\Delta\text{E}/\text{min})$ ]	Erhöh. [%]	SoxL Mut.	rel. Aktiv. [ $\text{m}(\Delta\text{E}/\text{min})$ ]	Erhöh. [%]
- SoxL	15,9	0			
SoxL	29,4	85 (+/- 3,2)	SoxL <sub>68/72</sub>	21,2	33 (+/- 9,6)
SoxL <sub>68</sub>	30,3	90 (+/- 7)	SoxL <sub>68/184</sub>	23,3	46 (+/- 7,3)
SoxL <sub>72</sub>	28,1	77 (+/- 5,4)	SoxL <sub>72/179/184</sub>	22,3	40 (+/- 4,2)
SoxL <sub>179</sub>	24,3	53 (+/- 2,6)	SoxL <sub>68/179/184</sub>	23,1	45 (+/- 8,2)
SoxL <sub>184</sub>	27,2	71 (+/- 5,9)	SoxL <sub>68/72/184</sub>	23,0	45 (+/- 4,4)
SoxL <sub>68/179</sub>	24,9	57 (+/- 11,2)	SoxL <sub>68/72/179</sub>	23,3	46 (+/- 3,1)
SoxL <sub>72/179</sub>	26,4	66 (+/- 18,6)	SoxL <sub>[-Cys]</sub>	15,7	-1,5 (+/- 1,9)
SoxL <sub>72/184</sub>	24,7	55 (+/- 11,6)			
SoxL <sub>179/184</sub>	24,4	53 (+/- 16)			

Mit diesen Versuchen konnte ein Einfluss von SoxL auf das Sox System bestätigt werden. Hier wurde vermutet, dass dieser auf eine Wechselwirkung mit dem Schlüsselprotein SoxYZ beruht. Vor allem durch den Einsatz der SoxL<sub>[-Cys]</sub> konnte weiterhin bestätigt werden, dass die Cysteine für diese wahrscheinliche Wechselwirkung verantwortlich sind, da bei Zufuhr dieser Mutante keinerlei Verlängerung der „lag“-Phase, als auch eine Aktivitätssteigerung des Sox Systems erzielt werden konnte. Die genaue Funktion der einzelnen Cysteine konnte mit diesen Experimenten nur im geringen Maße erschlossen werden, da sie ambivalente Ergebnisse lieferten und eine hohe Komplexität zwischen einem möglichen SoxL-SoxYZ-Komplex aufzeigten.

Im Gegensatz dazu, zeigte die Zugabe von Alvin\_0258 keine Veränderung der Aktivität des Sox Systems (**Abb. 3.40**). Weder eine Verlängerung der Initialphase noch eine Steigerung der Aktivität konnte verzeichnet werden. Dies zeigt, dass nur SoxL einen direkten Einfluss auf das Sox System und vor allem auf SoxYZ besitzt.

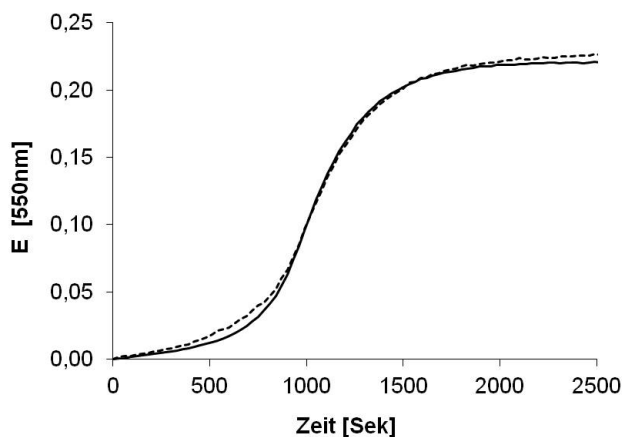


Abbildung 3.40: **Beeinflussung der Aktivitäten des rekonstituierten Sox Systems in Anwesenheit von Alvin\_0258.** Reaktionsansätze enthielten 1  $\mu\text{M}$  SoxYZ, 1  $\mu\text{M}$  Alvin\_0258, 0,05  $\mu\text{M}$  SoxB, 0,1  $\mu\text{M}$  SoxXAK, 35  $\mu\text{M}$  Cytochrom *c*, 100  $\mu\text{M}$  Thiosulfat bei einem pH von 6,8. Die Cytochrom *c* Reduktion wurde durch die Erhöhung der Absorption bei 550 nm aufgenommen. Die Assays wurden mit 1  $\mu\text{M}$  SoxYZ (**durchgehende Linie**) bzw. in Anwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  Alvin\_0258 (**gestrichelte Linie**) durchgeführt.

### 3.6 Physiologische Untersuchung der Schwefeltransferase-defizienten *Alc. vinosum* Mutanten

Im folgenden Abschnitt sollte überprüft werden, ob die in dieser Arbeit untersuchten periplasmatischen Schwefeltransferasen einen Einfluss auf die Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen haben. Hierfür wurden mehrere *in frame*-Deletionsmutanten hergestellt und diese im „Batch“-Verfahren untersucht. Neben dem Sox-System katalysiert die periplasmatische Thiosulfat Dehydrogenase (TsdA) die Oxidation von Thiosulfat. Bei einem niedrigen pH wird dabei das Produkt Tetrathionat gebildet. Um einen möglichen Einfluss von Alvin\_0258 und SoxL unabhängig von TsdA untersuchen zu können, wurden die beiden Gene in einer bereits TsdA-defizienten *Alc. vinosum* Mutante deletiert. Während der Untersuchung und Quantifizierung der Oxidationsraten von verschiedenen Schwefelverbindungen wurde die *Alc. vinosum*  $\Delta\text{tsd}$  als Standard verwendet.

### 3.6.1 Herstellung und Untersuchung der „In Frame“-Schwefeltransferase-defizienten Mutanten

Im Gegensatz zur Verwendung einer Resistenzkassette wird bei einer *in frame*-Deletion die Transkription der stromabwärts gelegenen Gene nicht beeinflusst. Eine Resistenzkassette kann polare Effekte ausüben und das Leseraster beschädigen. Daher wurden für diese Arbeit die Gene *Alvin\_0258* und *soxL* mittels *in frame*-Deletion in einer bereits *TsdA*-defizienten Mutante inaktiviert.

Über Gene SOEing PCR wurden Amplifikate hergestellt, die nur die flankierenden Bereiche von *Alvin\_0258* und *soxL* besaßen. Diese wurden in den „suicide“-Vektor *pK18mobsacB* kloniert. Die resultierenden Plasmide *pK18mobSacBΔ0258* und *pK18mobSacBΔsoxL* wurden in den Donorstamm *E. coli* S17-1 transformiert. Über Konjugation gelangte dieser Vektor in *Alc. vinosum ΔtsdA*. Eine homologe Rekombination wurde durch die Sensitivität von *Alc. vinosum* gegenüber der Saccharose Produkte des Vektors ermöglicht. Somit entstanden die Mutanten *Alc. vinosum ΔtsdAΔ0258* und *Alc. vinosum ΔtsdAΔsoxL*. Die Zweifach-Schwefeltransferase-defiziente Mutante *Alc. vinosum ΔtsdAΔsoxLΔ0258* wurde erhalten, indem das Plasmid *pK18mobSacBΔsoxL* in die bereits erhaltene *Alc. vinosum ΔtsdAΔ0258* Mutante konjugiert wurde. Alle Mutanten wurden mittels Southern Blot überprüft.

Die Mutanten wurden anschließend auf ihre Fähigkeit untersucht reduzierte Schwefelverbindungen zu oxidieren. Dafür wurden die Mutanten sowohl im „Batch“-, als auch „Fermenter“-Verfahren mit unterschiedlichen Mengen an Sulfid, Thiosulfat oder Schwefel angezogen. Der Verbrauch der Substrate, die Bildung der Produkte und die Bildung bzw. der Abbau von Schwefelkugeln wurde im Verlauf der Oxidation überprüft. Unter all den verwendeten Bedingungen konnte während der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen kein Unterschied zwischen den Schwefeltransferase-defizienten Mutanten und dem Standard (*Alc. vinosum Δtsd*) ausgemacht werden. In nachfolgenden Versuchen mit variierenden Bedingungen müsste dieser Umstand weiter überprüft werden.

### 3.6.2 Rhodanese-Aktivität der *Alc. vinosum* Deletionsmutanten

Die hier untersuchten Schwefeltransferasen besitzen jeweils eine Rhodanese-Domäne, welche es ihnen ermöglichen sollte Schwefel von Thiosulfat oder Persulfid auf Cyanid zu übertragen. Mit dem Vorhandensein der Schwefeltransferase-defizienten Mutanten konnte dies im ersten Ansatz untersucht werden. Alle Stämme (*Alc. vinosum ΔtsdA*, *Alc. vinosum ΔtsdAΔsoxL*, *Alc. vinosum ΔtsdAΔ0258*, *Alc. vinosum ΔtsdAΔsoxLΔ0258*) wurden photoorganoheterotroph angezogen und nach 4 Tagen geerntet. Die Zellen wurden mittels Ultraschall lysiert, die Zelltrümmer abzentrifugiert und das erhaltene Lysat (Überstand der Zentrifugation) einer Ultrazentrifugation (45.000 rpm; 3 Std.) unterzogen. Hierdurch konnte die lösliche von der Membranfraktion getrennt werden. Die Proteinkonzentrationen der löslichen Fraktionen jeder Mutante wurde bestimmt und 100 µg einem Thiosulfat:Cyanide Schwefeltransferase Assay (TST-Assay) unterzogen.

Bei der Verwendung der löslichen Fraktion von *Alc. vinosum ΔtsdA* konnte im Rhodanese Assay eine spezifische Aktivität von 180 mU/mg erhalten werden. Eine nahezu gleiche Aktivität (179 mU/mg) erhielt man mit der löslichen Fraktion aus *Alc. vinosum ΔtsdAΔsoxL*. Vorherige Untersuchungen hatten bereits gezeigt, dass SoxL keine charakteristische Thiosulfat:Cyanide Schwefeltransferase Aktivität besitzt (Welte et al., 2009), was hiermit bestätigt werden konnte. Im Gegensatz dazu, waren die Aktivitäten um die Hälfte geringer, wenn man die löslichen Fraktionen

von Mutanten verwendete, in denen Alvin\_0258 deletiert vorlag (**Abb. 3.9**). Die periplasmatische Rhodanese Alvin\_0258 besitzt also eine Thiosulfat:Cyanid Schwefeltransferase Aktivität, die bei photoorganoheterotrophen Wachstum ungefähr 50 % der Gesamt-Rhodanese-Aktivität in *Alc. vinosum* ausmacht.

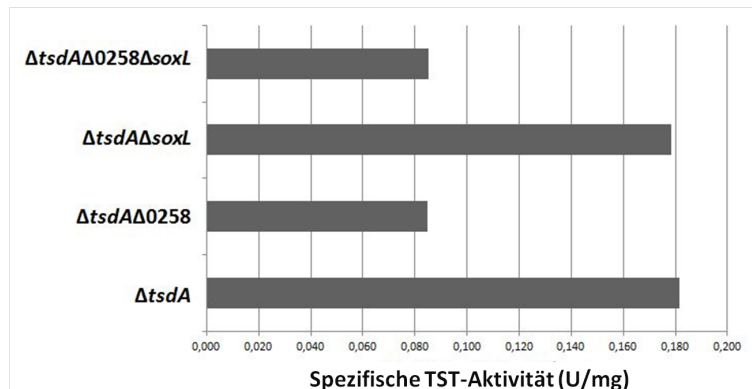


Abbildung 3.41: **Spezifische Thiosulfat:Cyanid Schwefeltransferase Aktivität der löslichen Fraktionen, die aus den verschiedenen Schwefeltransferase-defizienten *Alc. vinosum* Mutanten erhalten wurden.** Assays wurden nach Ray et al. (2000) mit 100  $\mu\text{g}$  Protein aus den löslichen Fraktionen durchgeführt. Lösliche Fraktionen wurden aus *Alc. vinosum*  $\Delta tsdA$ ,  $\Delta tsdA\Delta 0258$ ,  $\Delta tsdA\Delta soxL$  und  $\Delta tsdA\Delta 0258\Delta soxL$  aufgereinigt.



## 4 Diskussion

Die ersten Schritte der Schwefeloxidation in *Allochromatium vinosum* finden im Periplasma statt. Auch hier werden reduzierte Schwefelverbindungen oxidiert, wobei Schwefelkugeln im periplasmatischen Raum gebildet werden. Im Anschluss wird der gespeicherte Schwefel erneut mobilisiert, um anschließend im Cytoplasma vollständig zu Sulfat oxidiert zu werden. Die genauen periplasmatischen Schwefeltransfer-Reaktionen während der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen und die damit verbundene Bildung der Schwefelkugeln ist immer noch nicht vollständig geklärt. Mögliche Kandidaten für den Transfer von Schwefelverbindungen zu den Schwefelkugeln wären periplasmatische Schwefeltransferasen, da sie in der Lage sind, die Bildung und Umformung von sulfanschwefelhaltigen Verbindungen zu katalysieren (Westley et al., 1983).

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Rolle der Schwefeltransferasen Alvin\_0258 und Alvin\_3028 während der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen zu untersuchen. Somit lag der Fokus darauf, die Schwefeltransferasen strukturell zu analysieren und die katalytische Funktion zu charakterisieren. Hierbei sollte untersucht werden, ob sie in der Lage sind, schwefelhaltige Substrate zu nutzen, indem sie den Sulfanschwefel binden und zu einem Akzeptor transportieren.

Im Periplasma wird die Oxidation von Thiosulfat über die Thiosulfat-Dehydrogenase (Denkman et al., 2012) sowie dem Sox System katalysiert. Im Letzteren müssen immer noch einige detaillierte Mechanismen, vor allem zwischen möglichen Reaktionspartnern, geklärt werden. Hier wurde der Einfluss der zuvor untersuchten Schwefeltransferase SoxL (Welte et al., 2009) auf die Aktivität des Sox Systems analysiert, da eine Wechselwirkung mit dem Schlüsselprotein SoxYZ vermutet wurde. Auch die mögliche Fähigkeit den Sulfanschwefel von SoxYZ zu übernehmen, um den Komplex zu regenerieren und weiter zu den Schwefelkugeln zu transferieren, sollte mit Untersuchungen geklärt werden. Hierzu wurden die strukturellen Eigenschaften von SoxYZ und SoxL sowie deren Einfluss auf den Aktivitätsverlauf des Sox Systems analysiert.

### 4.1 Die membrangebundene Schwefeltransferase Alvin\_3028

Die Struktur der potentiellen Schwefeltransferase Alvin\_3028 konnte mittels Computerprogrammen („TMHMM“, „SOSUI“, Expasy) annähernd untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass das Protein über eine Transmembranhelix am N-Terminus in der Membran verankert ist. Fraglich blieb aber die räumliche Lokalisierung des restlichen Proteins, dessen katalytische Rhodanesedomäne am C-Terminus enthalten ist. Bioinformatische Programme konnten nämlich nicht eindeutig vorhersagen, ob sich das katalytische Zentrum im Cytoplasma oder Periplasma befindet. Diese Information ist vor allem wichtig, wenn die genaue Funktion von Alvin\_3028 und dessen mögliche Reaktionspartner untersucht werden sollen. Mittels Fusionierung von Reporterproteinen am C-Terminus von Alvin\_3028, konnte folglich eine Lokalisierung des Rhodanese-Motivs im Cytoplasma festgestellt werden.

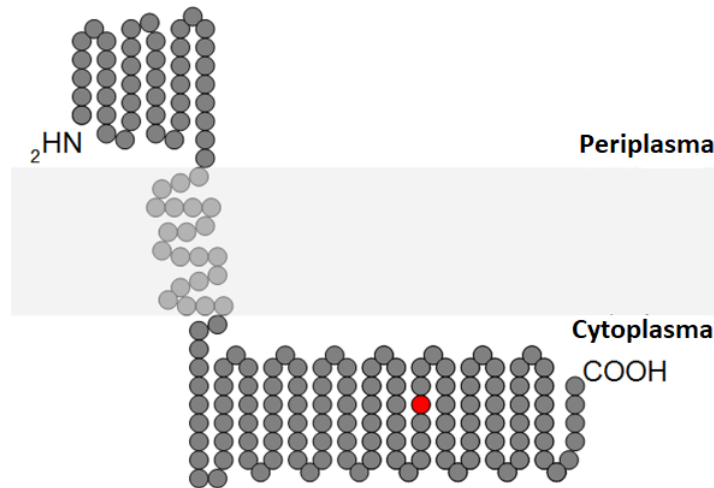


Abbildung 4.1: **Schematische Darstellung der Proteinstruktur von Alvin\_3028.** Das katalytische Cystein (rot), innerhalb der Rhodanesedomäne, befindet sich im Cytoplasma.

Die Bindung der Schwefeltransferase in der Membran wurde weiterhin über heterologe Überexpression in *E. coli* und einer anschließenden Aufreinigung bestätigt, da Alvin\_3028 aus der Membranfraktion solubilisiert werden musste, um es letztlich zu isolieren. Dies zeigt, dass sich die Schwefeltransferase wahrscheinlich ebenfalls in *Alc. vinosum* in der inneren Membran befindet und dessen katalytisches Cystein ins Cytoplasma reicht.

Dieses katalytische Cystein befindet sich in einem CRSGAQ-Motiv, welches in allen Alvin\_3028 Homologen innerhalb der Chromatiaceae konserviert vorliegt. Auch die Aminosäure Glutamin am Ende des Motivs ist in allen Vertretern vorzufinden, obwohl das Vorhandensein dieser von dem ursprünglichen Rhodanese-Motiv (CRXGX[R/T]) abweicht (Bordo and Bork, 2002). Trotz dieser Abweichung zeigte Alvin\_3028 eine Thiosulfat:Cyanid Schwefeltransferaseaktivität und ist somit in der Lage den Sulfanschwefel von Thiosulfat zu binden und auf einen Akzeptor zu transferieren. Hinter dem Rhodanese-Motiv befindet sich ein weiteres Cystein, welches ebenfalls unter allen untersuchten Vertretern der Chromatiaceae konserviert vorliegt. Weitere Analysen mit mutierten Alvin\_3028 Proteinen, bei denen Cys<sub>96</sub> bzw. Cys<sub>106</sub> gegen Serine ausgetauscht werden könnten, sollten Aufschluss darüber geben, ob dieses zusätzliche Cystein ebenfalls eine Rolle im katalytischen Prozess spielt oder für die strukturellen Eigenschaften dieser Schwefeltransferase vonnöten ist. Da das katalytische Cys<sub>96</sub> allerdings ins Cytoplasma reicht, erscheint Thiosulfat als natürliches Substrat unwahrscheinlich, da die Oxidation von Thiosulfat im Periplasma durch das Sox System katalysiert wird (Hensen et al., 2006).

Weiterhin wurden alternative Substrate getestet, darunter Polysulfide und Glutathionpersulfid (GSSH). Beide Substrate konnten von Alvin\_3028 verwertet werden, wobei die Aktivität mit Polysulfiden als Substrat um einiges höher ausfiel, als für GSSH. Bei der Oxidation von Polysulfiden treten in *Alc. vinosum* intrazelluläre Schwefelkugeln, als obligates Intermediat auf, wobei dieser genaue Vorgang noch nicht vollständig geklärt werden konnte (Steudel et al., 1990). Zu vermuten ist allerdings, dass dies ebenfalls im Periplasma abläuft und Polysulfide wiederum als natürliche Substrate von Alvin\_3028 auszuschließen sind. Da es sich bei Alvin\_3028 nun um eine cytoplasmatische Schwefeltransferase handelt, wäre persulfuriertes Glutathionamid (GASSH) als Substrat



nicht auszuschließen. Hierbei handelt es sich um ein prognostiziertes Carriermolekül, welches Schwefelatome aus den Schwefelkugeln vom Periplasma in Cytoplasma transportieren könnte (Cort et al., 2008). Trotz der geringen Aktivität ist Alvin\_3028 aber in der Lage, persulfuriertes Glutathion als Substrat zu verwerten. Somit könnte Alvin\_3028 vielleicht in der Lage sein, den Schwefel vom Carriermolekül zu übernehmen, um es an weitere Proteine im Cytoplasma zu transferieren, welche für weitere Oxidationsvorgänge verantwortlich sind.

Ein Hinweis darauf könnten die Ergebnisse der Genregulation von Alvin\_3028 liefern. Von Weissgerber et al. (2013) wurde bereits ein transkriptionelles Profil aller Gene aus *Alc. vinosum*, darunter auch Alvin\_3028, erstellt. Bei diesen Microarray Experimenten stellte sich heraus, dass die mRNA Level von Alvin\_3028 unter allen Wachstumsbedingungen (50 mM Schwefel, 4 mM Sulfid, 4 mM Thiosulfat) konstant blieben. Deswegen sollte eine alternative Herangehensweise diesen Umstand untersuchen. Hierfür wurden die mRNA Level im zeitlichen Verlauf der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen näher untersucht, um eine mögliche Genregulierung während der Bildung bzw. des Abbaus von Schwefelkugeln zu erhalten. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten der Thiosulfat-, Sulfid- und Schwefeloxidation wurden daher Zellen aus dem Fermenter entnommen, die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und geeignete Primer für Alvin\_3028 eingesetzt.

Hierbei zeigte sich, dass während der Thiosulfat- sowie der Sulfidoxidation alle mRNA Level für Alvin\_3028 konstant blieben, womit das Alvin\_3028-Gen in Anwesenheit dieser Substrate folglich zu keinem Zeitpunkt der Schwefelkugelbildung reguliert, sondern konstitutiv exprimiert wurde. Andere Ergebnisse konnten allerdings mit dem Einsatz von elementarem Schwefel erhalten werden. Hier waren die mRNA Level von Alvin\_3028 während der späteren Schwefeloxidation (nach 8 und 24 Stunden) leicht erhöht. Beim Wechsel von photoorganoheterotrophen zum photolithoautotrophen Wachstum, bei welchem elementarer Schwefel als Elektronendonator dient, wird Alvin\_3028 also in einem etwas höherem Maße exprimiert. Dies scheint vor allem während des Schwefelkugelabbaus stattzufinden. Dies kann zwar anhand der vorhandenen Daten nur vermutet werden, weil externer und interner Schwefel nicht voneinander unterschieden werden kann, allerdings war die Sulfatkonzentration zu diesen Zeitpunkten bereits sehr hoch. Dies zeigt, dass interner Schwefel aus den Schwefelkugeln mobilisiert und im Cytoplasma oxidiert wurde. Somit könnte Alvin\_3028 durchaus bei der Mobilisierung des Schwefels aus den Schwefelkugeln eine Rolle spielen, vor allem wenn die Konzentration an intrazellulärem Schwefel sehr hoch ist. Da für die Versuche eine wesentlich höhere Menge an Schwefel (50 mM) verwendet wurde, als Thiosulfat und Sulfid (4 mM), zeigte sich hier auch eine sehr starke Trübung der Kultur, welches erneut auf eine hohe Menge an Schwefelkugeln hindeutet. Bei Verwendung von höheren Konzentrationen an Thiosulfat oder Sulfid hätte man vielleicht ebenfalls einen höheren mRNA Level für Alvin\_3028 erhalten, da mehr Schwefelkugeln gebildet worden wären. Falls jedoch diese niedrige Regulation von Alvin\_3028 auf eine konstitutive Genexpression von Alvin\_3028 hindeutet, kann eine Beteiligung dieser Schwefeltransferase am dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel trotzdem nicht ausgeschlossen werden, denn auch Gene, welche z.B. für die Schwefelkugelproteine kodieren, werden konstitutiv exprimiert (Prange et al., 2004).

Zudem scheint Alvin\_3028 durchaus eine wichtige Rolle im Stoffwechsel von *Alc. vinosum* zu spielen, da die Erstellung einer *in frame*-Deletionsmutante sowie die Inserierung einer Kanamycin- bzw. Streptomycin-Kassette erfolglos blieb. Mit den hier genannten Methoden können insofern keine lebensfähigen *Alc. vinosum* Mutanten erhalten werden, in denen das Alvin\_3028-Gen vollständig

fehlt. Somit war eine phänotypische Analyse einer Knockout-Mutante nicht möglich. Die genaue Funktion von Alvin\_3028 könnte in weiteren Untersuchungen mittels RNA-Silencing untersucht werden. Hier ist eine Deletion des Gens nicht nötig, da spezielle kurze RNA-Stücke eine Wechselwirkung mit der gebildeten mRNA eingehen und über mehrere Schritte die Translation zum funktionsfähigen Protein verhindert wird (Mizuno et al., 1984). Somit könnte eine Beteiligung von Alvin\_3028 am dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel in *Alc. vinosum*, vor allem während der Mobilisierung von Schwefelkugeln, näher untersucht werden. In dieser Arbeit lag der Fokus auf Schwefeltransferasen im Periplasma, wodurch diese vorgeschlagenen Versuche nicht weiter durchgeführt wurden.

Um trotzdem Aufschluss über eine mögliche Funktion von Alvin\_3028 zu erhalten, wurde die Proteinsequenz von Alvin\_3028 sowie die Genumgebung näher untersucht. Hier zeigte sich, dass Alvin\_3028 Homologe nur in schwefeloxidierenden Bakterien, den Chromatiaceae, zu finden sind. Diese sind in der Lage ihre Schwefelkugeln im Periplasma der Zellen zu lagern. Alle Alvin\_3028 Homologe sind ebenfalls als Schwefeltransferasen annotiert und eine Rhodanesedomäne sowie eine Transmembranhelix am N-Terminus konnte detektiert werden. Im Gegensatz dazu, zeigten die Analysen der Proteinsequenzen aus der Gruppe der Ectothiorhodospiraceae (*Halorhodospira halophila*, *Thioalkalivibrio sulfidiphilus*), verglichen mit Alvin\_3028, nur geringe Ähnlichkeiten (ca. 30 %). Doch auch hier wurde eine Rhodanesedomäne und Transmembranhelix gefunden.

Bei näherer Untersuchung der Genregion von Alvin\_3028 zeigte sich weiterhin, dass ähnliche Gene mit gleicher annotierter Proteinfunktion, sowohl in Vertretern anderer Chromatiaceae sowie Ectothiorhodospiraceae vorhanden sind. Bei diesen potentiellen Proteinen handelt es sich um einen transkriptionellen Regulator der ArsR Familie und ein Protein-Export Protein (SecB). Stromaufwärts von Alvin\_3028 befindet sich weiterhin das Gen *gspA*, welches für eine Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase kodiert. Ausnahmen wurden in der Genomsequenz von *Halorhodospira halophila* gefunden, da hier ein transkriptioneller Regulator der Fis Familie angegeben wurde, welcher in gegensätzlicher Richtung transkribiert wird und keine Ähnlichkeiten zu den Regulatoren der ArsR Familie zeigt. In der Genomsequenz von *Thioalkalivibrio sulfidiphilus* wurden wiederum Gene detektiert, welche für ein Thioredoxin bzw. Glutaredoxin kodieren und stromabwärts von *gspA* liegen.

Bei einem ArsR Transkriptionsregulator handelt es sich um einen Repressor, welcher durch ein Helix-Turn-Helix-Motiv an die DNA von Zielgenen binden kann. Als Sensor bindet er an die DNA, wenn die Metallkonzentrationen in der Zelle gering sind und löst sich wiederum, wenn eine Genexpression nötig ist, damit die Zelle mit einer hohen Konzentration an Metallionen oder Schadstoffen, wie Arsen, umgehen kann (Busenlehner et al., 2003). SecB-Exportproteine halten Proteine in einen konformell, transportablen Zustand, welche dann wiederum durch andere Proteine des Sec-Systems über die Membran aus dem Cytoplasma transportiert werden (Henderson et al., 2004). Die Gensequenz von Alvin\_3028 liegt direkt dazwischen und es wäre vorstellbar, dass diese Schwefeltransferase an der Detoxifizierung von körperfremden Stoffen beteiligt ist. In *E. coli* wurde bereits beschrieben, dass eine Glutathion S-Transferase (GstB) Arsen direkt zu Arsenit reduzieren kann, wenn reduziertes Glutathion (GSH) als Elektronendonator fungiert (Chrysostomou et al., 2015). Beim Vergleich der Proteinsequenzen von *E. coli* GstB und Alvin\_3028 fanden sich allerdings keine Übereinstimmungen, vor allem nicht im katalytischen Zentrum der Schwefeltransferase. Daher kann nur

spekuliert werden, ob Alvin\_3028 Arsen oder andere toxische Stoffe mittels Glutathion zumindest binden kann, ohne es selbst zu reduzieren. In diesem Falle könnte es weiterhin vom Sec-System aus der cytoplasmatischen Membran hinaus transportiert werden, womit der toxische Stoff aus dem Organismus befördert werden würde. SecB wäre dann dafür verantwortlich, Alvin\_3028 in einem strukturell stabilen Zustand zu halten. Dies würde gegebenenfalls erklären, warum Alvin\_3028 im aufgereinigten Zustand schnell denaturierte und seine Aktivität verlor, da der stabilisierende Faktor fehlte. Weitere Untersuchungen müssten klären, ob Alvin\_3028 tatsächlich an einer Detoxifizierung oder an der oben beschriebenen Aufnahme von Schwefel beteiligt ist, denn annotierte Gene müssen nicht direkt die prognostizierte Funktion aufweisen.

In *Paracoccus pantotrophus*, ein Vertreter der Rhodobacteriaceae, wurde das Gen *soxR* ebenfalls als transkriptioneller Regulator der ArsR Familie annotiert, welches das erste Gen innerhalb der Sox Genregion soxRSVWXYZA-H ist (Friedrich et al., 2001). Das aufgereinigte SoxR Protein konnte tatsächlich als Repressorprotein identifiziert werden, welches an den Promoter des Sox-Genclusters bindet und nicht an eine Genregion, deren korrespondierende Proteine für eine Arsendetoxifizierung verantwortlich sind (Rother et al., 2005). Somit könnte auch Alvin\_3027 als Repressor an einen anderen Genbereich binden, welcher für Proteine des dissimilatorischen Schwefelstoffwechsels kodiert. Somit würde die Funktion der membrangebundenen Schwefeltransferase Alvin\_3028 demnach auch in diesem Bereich zu suchen sein. Proteinsequenzvergleiche von Alvin\_3027 mit SoxR aus *P. pantotrophus* ergaben immerhin Übereinstimmungen von 34%.

Eine Beteiligung am dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel ist somit nicht auszuschließen. Ein Hinweis dafür könnten weiterhin die gleichen Genumgebungen rund um die Alvin\_3028 Homologe in Vertretern von schwefeloxidierenden Bakterien, welche zu den Chromatiaceae bzw. Ectothiorhodospiraceae gehören, liefern. Beide Bakterienfamilien bilden die physiologische Gruppe der phototrophen Schwefelpurpurbakterien (PSB) und sind in der Lage Schwefelkugeln zu bilden, welche bei den Ectothiorhodospiraceae allerdings außerhalb der Zelle zu finden sind. Es ist also zu vermuten, dass Alvin\_3028 sowie die gefundenen Proteinhomologen eine ähnliche Rolle innerhalb des Stoffwechsels dieser schwefeloxidierenden Bakterien spielen. Diese Vermutung wird durch das Fehlen solcher Proteinhomologen in Vertretern der Chlorobiaceae (*Chlorobaculum tepidum*, *Chlorobaculum parvum*) unterstützt.

## 4.2 Die periplasmatische Schwefeltransferase Alvin\_0258

### Strukturelle und katalytische Eigenschaften von Alvin\_0258

Das Gen Alvin\_0258 wurde als potentielle Schwefeltransferase annotiert, da das Rhodanese-Motiv CRTGNR vorhanden ist, welches unter Vertretern der Chromatiaceae stark konserviert vorliegt. Dieses Motiv weicht nicht, wie bei Alvin\_3028, vom typischen Rhodanese-Motiv (CRXGX[R/T]) ab (Bordo and Bork, 2002). Potentielle Signalpeptide, innerhalb des N-Terminus, sind ebenfalls konserviert, welche auf einen Transport ins Periplasma hindeuten und ein weiteres CXXC Motiv ist hinter der Rhodanese-domäne vorhanden. Diese Sequenzanalysen lassen darauf schließen, dass in vielen Vertretern der Chromatiaceae Alvin\_0258 Homologe vorhanden sind, welche eine ähnliche Funktion besitzen könnten.

Über heterologe Überexpression in *E. coli* und anschließender Aufreinigung konnte Alvin\_0258

vollständig charakterisiert werden, wobei ein pH-Optimum zwischen 8,5 und 10 vorliegt. Unterschiedliche pH-Optima in einem Bereich von 8,5-11 wurden bereits für Rhodanesen aus anderen Organismen beschrieben (Jarabak and Westley, 1974; Lee et al., 1995; Agboola and Okonji, 2004; Saidu, 2004). Weiterhin wurde ein Temperaturoptimum von 60 °C bestimmt, wobei Alvin\_0258 bei längerer Aufbewahrung bei dieser Temperatur an Stabilität und somit Funktionalität verlor. Hohe Temperaturoptima wurden ebenfalls in Rhodanesen anderer Organismen bestimmt (Sörbo, 1953a; Ehigie et al., 2015). Bei der optimalen Wachstumstemperatur von *Alc. vinosum* (30 °C) blieb das Protein aber stabil und folglich wurden weitere Untersuchungen bei dieser Temperatur durchgeführt. Die Schwefeltransferase Alvin\_0258 zeigte eine Thiosulfat:Cyanid Schwefeltransferaseaktivität, wobei Thiosulfat mit einer höheren Affinität als Cyanid gebunden wurde. Dies lässt vermuten, dass Alvin\_0258 wahrscheinlich nicht in seiner natürlichen Umgebung Sulfanschwefel auf Cyanid überträgt, um dieses innerhalb des Organismus zu detoxifizieren und somit eher eine Rolle im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel von *Alc. vinosum* spielt. Weiterhin konnte ein typischer „Ping-Pong“-Mechanismus für Alvin\_0258 bestimmt werden, welcher in vielen Rhodanesen vertreten ist (Vazquez et al., 1987). Hierbei wird zunächst Thiosulfat als Substrat gebunden und das Produkt Sulfit gebildet, wobei der Sulfanschwefel des Thiosulfats an der Rhodanese verbleibt. Erst dann kann ein zweites Substrat, in diesem Fall Cyanid, an die Rhodanese binden und es entsteht das zweite Produkt Thiocyanat. Die Rhodanese geht dabei in ihren Ausgangszustand zurück. Es werden also zwei Substrate in zwei Produkte umgesetzt, allerdings in voneinander getrennten Reaktionsschritten.

Die Schwefeltransferase Alvin\_0258 ist nicht nur in der Lage, Thiosulfat hochaffin zu binden, sondern auch Polysulfide. Mit diesem Substrat wurde auch eine hohe Aktivität erzielt, welche vergleichbar mit dem Sud Protein aus *Wolinella succinogenes* ist (Klimmek et al., 1998). Im Gegensatz dazu, wurde Glutathionpersulfid mit niedriger Affinität gebunden und die spezifische Aktivität war deutlich geringer als mit Thiosulfat oder Polysulfiden.

### Mögliche Funktionen von Alvin\_0258

Obwohl die hergestellten Mutanten *Alc. vinosum*  $\Delta tsdA\Delta soxL\Delta 0258$  und *Alc. vinosum*  $\Delta tsdA\Delta 0258$  während des photolithoautotrophen Wachstums keinerlei Unterschiede zum Wildtyp zeigten, kann eine Beteiligung der Schwefeltransferase Alvin\_0258 an einigen dissimilatorischen Stoffwechselwegen nicht ausgeschlossen werden. Im Periplasma finden direkt mehrere Prozesse statt, bei denen die Oxidationsprodukte mobilisiert und transferiert werden müssen. Die Schwefeltransferase Alvin\_0258 wäre hierbei ein möglicher Kandidat, da diese ca. 50 % der Gesamt-Rhodanese Aktivität in *Alc. vinosum* besitzt und neben SoxL, die einzige annotierte Rhodanese im Periplasma ist.

Weiterhin wird das Gen Alvin\_0258 im Verlauf der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen reguliert. Es zeigte sich, dass Alvin\_0258 zu Beginn der Oxidation von Sulfid, Thiosulfat und elementarem Schwefel in einem höheren Maße exprimiert vorlag. Beim Vorhandensein von Schwefelkugeln waren dagegen die mRNA Level deutlich reduziert. Dies deutet darauf hin, dass Alvin\_0258 in der ersten Phase der Oxidation von reduzierten Schwefelverbindungen beteiligt sein könnte, nämlich während des Aufbaus von Schwefelkugeln, indem der Transfer von Sulfanschwefel zu den Schwefelkugelproteinen katalysiert wird.

Die Charakterisierung von Alvin\_0258 ergab, dass die Schwefeltransferase eine hohe Affinität

zu Thiosulfat und Polysulfiden besitzt. Thiosulfat wird in *Alc. vinosum* unter anderem vom Sox System oxidiert. Die Zugabe von Alvin\_0258 in das rekonstituierte System zeigte allerdings keine Beeinflussung der generellen Aktivität, womit eine Interaktion zwischen Alvin\_0258 und den Proteinen des Sox Systems unwahrscheinlich ist. Falls allerdings das Sox System während der Oxidation von Thiosulfat Polysulfide bildet (Frigaard and Dahl, 2009), wäre diese Schwefeltransferase in der Lage den Sulfanschwefel aufzunehmen und ihn weiter an die Schwefelkugeln zu transferieren. Bei den *in vitro* Experimenten mit dem rekonstituierten Sox System fehlte allerdings ein Akzeptor für den gebundenen Sulfanschwefel, wodurch eine fehlende Aktivitätssteigerung des Sox Systems zu erklären wäre.

Ein Indiz dafür, dass Alvin\_0258 Polysulfide als natürliches Substrat nutzen könnte, ist die hohe Affinität sowie die hohe Schwefeltransferase-Aktivität mit hergestellten Polysulfiden. Auch die Polysulfide, welche von SoxL produziert wurden, konnten von Alvin\_0258 verwendet werden. In *Alc. vinosum* werden diese hauptsächlich bei der Oxidation von Sulfid gebildet. Hier könnten diese von der Flavocytochrom-*c*-Sulfid-Dehydrogenase sowie von der Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase (SQR) geliefert werden, wobei das letztere membrangebundene Enzym als Hauptkandidat der Sulfid-Oxidation bekannt ist ((Frigaard and Dahl, 2009); Renate Zigann, persönliche Mitteilung). In *Wolinella succinogenes* besitzt das Sud-Protein die Funktion, Sulfanschwefel von Polysulfiden zu binden und dieses an eine membrangebundene Polysulfid-Reduktase (Psr) zu transferieren (Klimmek et al., 1998). In *Alc. vinosum* könnte die Schwefeltransferase Alvin\_0258 eine ähnliche Funktion besitzen, indem sie mit der SQR interagiert und Polysulfide zu den Schwefelkugeln transferiert, indem sie Schwefel an das katalytische Cystein bindet.

Interaktionsstudien mit Alvin\_0258 und periplasmatischen sowie membrangebundenen Proteinen müssten folgen, um die genaue Funktion von Alvin\_0258 zu untersuchen. Weiterhin sollten die Fermenter-, als auch Batch-Studien mit den hergestellten Mutanten, unter anderen Versuchsbedingungen (pH-Änderung; Polysulfide als Substrat) wiederholt und die Produkte genauer untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Alvin\_0258 aktiv die Konformation einer Peptidyl-Prolyl-Isomerase beeinflusst. Im Genom von *Alc. vinosum* wurde stromabwärts ein Gen (Alvin\_0259) gefunden, welches als Peptidyl-Prolyl-Isomerase annotiert wurde. Diese Enzyme katalysieren Bindungsachsenrotationen von Amid-Bindungen in Proteinen, an denen die Aminosäure Prolin beteiligt ist und gelten somit als Faltungshelferenzym. In *Arabidopsis thaliana* wurde gezeigt, dass drei von vier vorhandenen Cysteinen wesentlich für die katalytische Funktion des Enzyms sind und die Bildung von Disulfidbrücken zwischen katalytischen Cysteinen eine Konformationsänderung im Enzym bewirkt (Laxa et al., 2007). Ob und inwiefern eine Rhodanese diese Konformationsänderung bewirken kann, ist allerdings nicht bekannt. Prinzipiell erscheint diese Funktion für Alvin\_0258 jedoch unwahrscheinlich, da nur im *Thiocystis violascens*-Genom ebenfalls ein solches Gen gefunden werden konnte, welches für eine Peptidyl-Prolyl-Isomerase kodiert. In allen anderen Vertretern der Chromatiaceae konnte dieses nicht in der Nähe eines Alvin\_0258 Homologs detektiert werden. Generell wurden Alvin\_0258-Protein-Homologe in vielen Vertretern der Chromatiaceae (*Thiocystis violascens* und *Thiocapsa marina*) gefunden, welche über das gleiche Rhodanese- sowie über das CXXC-Motiv verfügen. Dies deutet darauf hin, dass diese Homologe eine ähnliche Funktion innerhalb der Chromatiaceae einnehmen und wahrscheinlich eine Rolle im dissimilatorischen Schwefelstoffwechsel

spielen könnten.

### 4.3 Die Rolle von SoxK auf die Funktion des Sox Systems

Ogawa et al. (2008) untersuchte ein SoxK Protein aus *Chlorobium tepidum*, welches hier einen stabilen Komplex zwischen SoxX und SoxA ermöglicht. Auch in *Alc. vinosum* wurde direkt stromabwärts von *soxA* ein *soxK*-Gen gefunden, welches zusammen mit *soxL*, in Anwesenheit von Thiosulfat, auf einem Leseraster transkribiert wird. Somit kann die transkriptionelle Einheit als *soxXAKL* zusammen gefasst werden.

Hensen et al. (2006) erstellte bereits, mittels Insertion einer Kanamycin-Kassette, eine *Alc. vinosum* rhd/ORF9 $\Omega$ Km Mutante (ORF9 = *soxK*), wodurch Teile der beiden Open-Reading-Frames entfernt wurden. Anschließende Fermenter-Versuche zeigten allerdings, dass die Thiosulfatoxidation dieser Mutante unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht eingeschränkt war. Daraufhin wurde eine *in frame*-Deletionsmutante *Alc. vinosum*  $\Delta$ *soxK* hergestellt (K. Kirsch) und mittels „Batch“-Verfahrens phänotypisch untersucht. Hierbei wurden die Oxidationsraten der Mutante, bei photolithoautotrophen Wachstum mit 4 mM Thiosulfat, mit dem Wildtyp verglichen. Hier zeigte sich, dass die Mutante nicht in der Lage war, Thiosulfat vollständig zu oxidieren, was auf eine Beeinträchtigung des SoxXA Proteins hindeutet (Molitor, 2013). Somit könnte das *Alc. vinosum* SoxK durchaus die Funktion besitzen, einen stabilen Komplex zwischen SoxX und SoxA auszubilden, welcher für die Funktionalität dieser Proteine unumgänglich ist. Die heterologe Produktion eines stabilen SoxXAK Komplexes in *E. coli* und dessen anschließende Aufreinigung würde dafür sprechen (Molitor, 2013). Trotzdem sollten die Versuche wiederholt und eine Komplementationsmutante generiert werden, um diesen Umstand zu verifizieren. Auch die Herstellung einer Doppelmutante *Alc. vinosum*  $\Delta$ *tsdA* $\Delta$ *soxK* käme in Frage, da der phänotypische Effekt weiter verstärkt werden könnte. Hier würde nämlich nicht die alternative Thiosulfatoxidation, katalysiert durch die Thiosulfatdehydrogenase, ablaufen und somit wäre eine mögliche Beeinträchtigung der Thiosulfatoxidation allein auf die Hemmung des Sox System zurückzuführen.

Weiterhin ist zu anzumerken, dass die Veränderungen der Versuchsdurchführung verantwortlich sein könnten, einen phänotypischen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante auszumachen. Während im Fermenter-Versuch der pH konstant gehalten wurde (pH = 7 +/- 0,1), kann sich dieser im Batch-Verfahren ändern. SoxXA könnte somit bei einem neutralen pH strukturell stabiler sein und seine Funktion bei der Thiosulfatoxidation uneingeschränkt durchführen. Im Gegensatz dazu, wäre die Struktur bei pH-Änderungen beeinträchtigt, wodurch eine Stabilisierung durch SoxK erforderlich wäre. Dies zeigt wiederum, dass ebenfalls die Versuchsbedingungen mit den anderen, hergestellten Mutanten variiert werden müssten, um gegebenenfalls eine phänotypischen Effekt zu erhalten.

Die phänotypischen Untersuchungen der *Alc. vinosum*  $\Delta$ *soxK* Mutante, während des photolithoautotrophen Wachstums mit 8 mM Sulfid, zeigten wiederum keine Beeinträchtigung von SoxXA. Sulfid konnte hier uneingeschränkt oxidiert werden. Dies bestätigt, dass das Sox System nicht hauptsächlich für die Oxidation von Sulfid verantwortlich ist und unterstreicht die Ergebnisse der Arbeitsgruppe, welche die Sulfid-Chinon-Oxidoredukase (SQR) als dominantes Schlüsselprotein für die Sulfid-Oxidation ausfindig machen konnten (R. Zigann; persönliche Mitteilung).

## 4.4 Struktur und Funktionalität von SoxYZ - Das Schlüsselenzym des Sox Systems

Der Proteinkomplex SoxYZ fungiert als zentrales Protein im Sox System und interagiert mit mehreren Sox-Proteinen (SoxB, SoxXA). Quentmeier et al. (2007) konnte feststellen, dass SoxYZ aus *Paracoccus pantotrophus* vermutlich durch eine sulfidinduzierte Konformationsänderung aktiviert wird. Auch Welte et al. (2009) konnte eine leichte Aktivitätssteigerung von SoxYZ vermerken, nachdem dieser Proteinkomplex mit Sulfid vorinkubiert wurde. Diese Aktivitätssteigerung wurde nun sehr deutlich, als das rekonstituierte Sox System ausschließlich mit Sox Proteinen aus *Alc. vinosum* untersucht wurde. Aber nicht nur eine Aktivitätssteigerung war zu verzeichnen, sondern auch eine zu Beginn der Reaktion auftretende „lag“-Phase, welche wahrscheinlich durch eine inaktivere Konformation von SoxYZ zustande kam.

Quentmeier et al. (2007) isolierte aus chemoautotroph wachsenden *P. pantotrophus* Zellen hohe Mengen einer heterotetrameren Form Sox(YZ<sub>2</sub>), welche sich in einem inaktiven Zustand befand. Diese Form kam durch eine Disulfidbildung zwischen zwei katalytischen Cysteinen der SoxY Einheiten zustande (CysY<sub>110</sub>-CysY<sub>110</sub>) und konnte durch Sulfid reduziert werden. Dadurch wurde SoxYZ im hohen Maße reaktiviert. Dieses Disulfid sowie die heterotetramere Form wurde auch mittels Kristallstruktur-Analysen von SoxY aus *Chlorobaculum thiosulfatophilum* nachgewiesen, welches in *E. coli* produziert wurde (Stout et al., 2007).

Das rekombinante SoxYZ aus *Alc. vinosum* wurde mittels Gelfiltrationschromatographie ebenfalls als heterodimere (SoxYZ) und heterotetramere Form (Sox(YZ)<sub>2</sub>) identifiziert. Im nativen Gel zeigte sich für Sox(YZ)<sub>2</sub> eine höhere Bande, wohingegen SoxYZ eine etwas tiefer liegende Bande aufwies. Die heterotetramere Form konnte nicht bei der Mutante SoxY<sub>C152S</sub>Z gefunden werden, womit auch hier die Ausbildung eines Disulfids zwischen den beiden katalytischen Cysteinen (Cys<sub>152</sub>) zweier SoxY Einheiten wahrscheinlich ist. Trotzdem war die Mutante in der Lage einen heterodimeren Komplex auszubilden und zerfiel nicht in die monomeren Einheiten. Genauso wie bei Quentmeier et al. (2008) konnte nachgewiesen werden, dass Sox(YZ)<sub>2</sub> durch Sulfid zur heterodimeren Form reduziert wird. Aber auch die heterodimere Form scheint durch Sulfid beeinflusst zu werden, wie im Späteren näher beleuchtet wird.

Eine Persulfurierung durch Sulfid sowie eine sulfidinduzierte Konformationsänderung wurden durch die Experimente mit dem thiolreaktiven 1,5-I-ADAENS deutlich. Mit SoxYZ „as isolated“ (Gemisch von SoxYZ und (Sox(YZ)<sub>2</sub>)) konnten die katalytischen Cysteine von SoxY keine Reaktion mit 1,5-I-ADAENS eingehen. Bei der heterotetrameren Form (Sox(YZ)<sub>2</sub>) lag dies wahrscheinlich an der bereits erwähnten Ausbildung eines Disulfides zwischen den Cysteinen der SoxY Einheiten. Im Falle der heterodimeren Form (SoxYZ) scheint das katalytische SoxY-Cys<sub>152</sub> wiederum verborgen zu sein, sodass 1,5-I-ADAENS keinen Zugang zu diesem fand. Im Gegensatz dazu, konnten die Cysteine in SoxZ mit 1,5-I-ADAENS reagieren und die fluoreszierende Proteinbande von SoxZ wurde sichtbar.

Nach einer Inkubation mit Sulfid konnte das Disulfid in Sox(YZ)<sub>2</sub> gespalten werden, womit nur noch die heterodimere Form vorlag. Weiterhin schien sich das katalytische SoxY-Cys<sub>152</sub> nun in einer zugänglicheren Form zu befinden, da eine Reaktion mit 1,5-I-ADAENS erfolgte. Außerdem

wurde gezeigt, dass sowohl das SoxY-Cys<sub>152</sub> sowie die Cysteine in SoxZ scheinbar persulfuriert werden. Nach der Zugabe eines Reduktionsmittel wurde nämlich 1,5-I-ADEANS, zusammen mit dem gebundenen Schwefel, abgespalten. Hier sollte angemerkt werden, dass 1,5-I-ADEANS nur vom Protein abgespalten werden kann, wenn dieses zuvor persulfuriert wurde.

Die Mutante SoxY<sub>C152S</sub> war dagegen nicht in der Lage 1,5-I-ADAENS zu binden oder mittels Sulfid persulfuriert zu werden. Eine Erklärung für diese Beobachtung wäre die Ausbildung eines weiteren heterotetrameren Komplexes durch Disulfide zwischen den Cysteinen der SoxZ Einheiten. Auch in diesem Fall wäre eine Bindung von 1,5-I-ADAENS nicht mehr möglich. Allerdings erscheint dies unwahrscheinlich, da mittels Gelfiltrationschromatographie nur die heterodimere Form aufgereinigt werden konnte. Somit scheinen die Cysteine in SoxZ ebenfalls das katalytische SoxY-Cys<sub>152</sub> für die Bindung von Sulfanschwefel oder 1,5-I-ADAENS zu benötigen.

Für die Aktivität von SoxYZ scheint eine Modifikation durch Sulfid entscheidend zu sein. Quentmeier et al. (2007) zeigte, dass sich die heterotetramere *P. pantotrophus* SoxYZ Form in einem inaktiven Zustand befand und nur durch Sulfidinkubation aktivieren ließ, da sie dadurch in die heterodimere Form überführt wurde. Der Einsatz von dem Nicht-Schwefel-Reduktionsmittel TCEP führte dagegen zu einem vollkommenen Verlust der Aktivität, welche auch nicht wieder durch Sulfid hergestellt werden konnte.

Für SoxYZ aus *Alc. vinosum* zeigte sich hingegen eine andere Situation. Mit SoxYZ „as isolated“ wies das Sox System eine „lag“-Phase auf, welche durch vorherige Sulfidinkubation deutlich reduziert werden konnte. Dies könnte nun ebenfalls so erklärt werden, dass auch hier die heterotetramere Form im Verlauf der Reaktion zur heterodimeren Form umgewandelt wird, womit eine direkte Umsetzung des Substrates möglich wäre. Diese Konformationsänderung wäre dann durch die „lag“-Phase gekennzeichnet, welche durch Sulfidinkubation entfällt, da im Vorfeld die Reduktion zur heterodimeren Form bereits gegeben ist. Allerdings zeigte vor allem die aufgereinigte, rein heterodimere Form (ohne Sulfidinkubation) eine „lag“-Phase, welche mit der heterotetrameren Form nicht erhalten wurde. Bei Letzterer wurde sogar eine direkte Reaktion, aber mit deutlich geringerer Aktivität verzeichnet. Diese Ergebnisse zeigen umso mehr, dass die Überführung in die heterodimere Form nicht ausreicht, um die „lag“-Phase zu überwinden. Eine zusätzliche Persulfurierung oder eine zusätzliche Konformationsänderung, die hier artifiziell mit Sulfid vermittelt wurde, ist nötig, um das katalytische SoxY-Cys<sub>152</sub> frei zu geben, damit SoxYZ in einen aktiven Zustand überführt werden kann. Bei der Aktivierung von SoxYZ handelt es sich also um einen hochkomplexen Vorgang, wobei Konformationsänderungen die Funktionalität des Proteinkomplexes sowie des gesamten Sox Systems bestimmen.

Um mögliche Erklärungen für diese Phänomene liefern zu können, soll zunächst einmal nur die heterodimere Form betrachtet werden. Hier könnte SoxYZ einen kooperativen Effekt besitzen. Dies ist eine Form der Allosterie, welche bei Proteinen mit mehreren Untereinheiten vorkommt. Dabei ist die Bindungsstärke zu einem Liganden davon abhängig, wie viele der restlichen Untereinheiten bereits einen Liganden tragen. Dabei kann sich das Protein, bestehend aus mehreren Untereinheiten, in einer „Tense“ (niedrigaffinen Form; T-) oder in einer „Relaxed“ (hochaffinen Form; R-) befinden. Die Bindung eines Liganden fördert eine Konformationsänderung, wodurch das Protein in



den R-Status überführt wird und somit das Substrat besser umsetzen kann (Koshland et al., 1966). Folglich könnte die sigmoide Kurve im Sox-Assay so erklärt werden, dass sich SoxYZ zunächst einmal im T-Zustand befindet, also niedrigaffin für das Substrat ist. Die anschließende Bindung des Substrates verhilft SoxYZ dann in die R-Form überzugehen, womit es für das Substrat hochaffin wird. Im Falle der Sulfidinkubation wurde SoxYZ bereits aktiviert und trägt somit schon ein oder mehrere Liganden. SoxYZ wäre daher bereits in der R-Form und die Reaktion liefere direkt ab. Diese Überführung zur möglichen R-Form konnte für SoxYZ „as isolated“ sowie für die heterodimere Form von SoxYZ gezeigt werden.

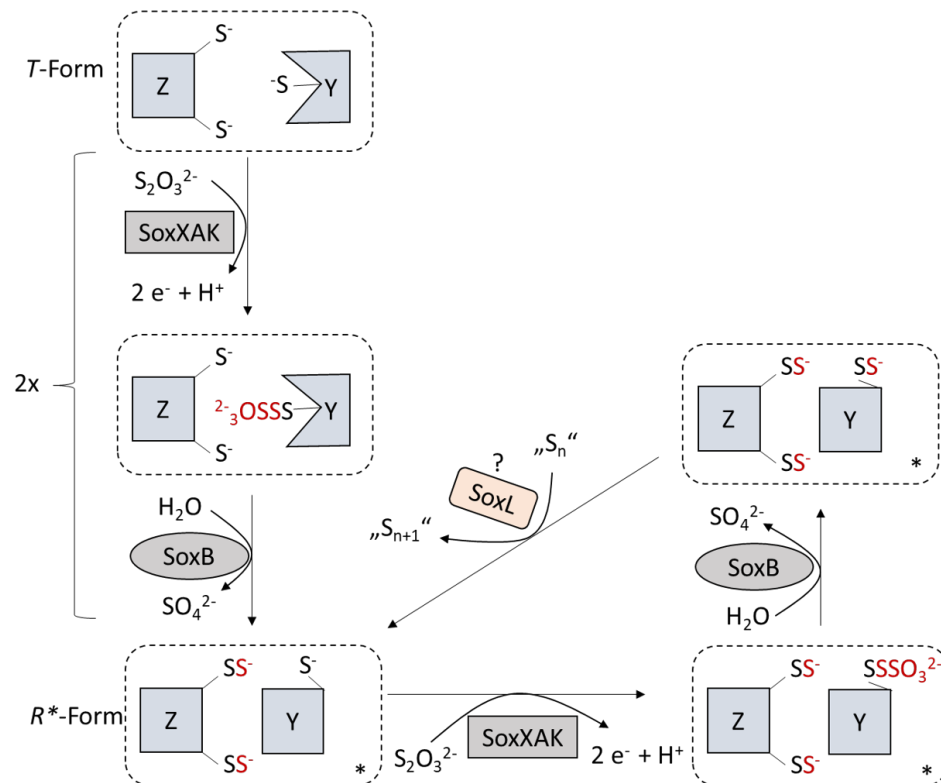


Abbildung 4.2: **Schematische Darstellung des Überganges von der T- zur R\*-Form von SoxYZ.** SoxY und SoxZ bilden einen Komplex, wobei sich dieser zunächst in der T-Form befindet. Nach Substratbindung wird das SoxY-Cys<sub>152</sub> aus seiner verborgenen Position „heraus gedrängt“, wodurch der Komplex in die R-Form übergeht. Um dies zu ermöglichen gibt SoxY-Cys<sub>152</sub> Sulfanschwefel an die Cysteine in SoxZ weiter, wodurch sich die Konformation des Proteinkomplexes ändert.

Wenn man zunächst von der heterodimeren Form und den oben beschriebenen Phänomenen ausgeht, könnte dies schematisch folgendermaßen ablaufen: SoxYZ befindet sich zu Beginn der Reaktion in der niedrigaffinen T-Form, wodurch die „lag“-Phase zustande kommt. Nur die Cysteine von SoxZ liegen frei zugänglich vor, wie durch die Experimente mit 1,5-I-ADAENS gezeigt werden konnte. Das Substrat, hier Thiosulfat, kann aber nur durch das Cys<sub>152</sub> gebunden werden, was wiederum durch die Mutante SoxY<sub>C152S</sub> gezeigt wurde. Das katalytische Cystein wird von SoxXAK oxidativ mit Thiosulfat beladen und Sulfat wird dann durch SoxB hydrolytisch abgespalten. Der verbleibende Sulfanschwefel könnte dann vom katalytischen Cys<sub>152</sub> an ein SoxZ-Cystein weiter gegeben werden. In einer zweiten Oxidationsrunde würde dann ebenfalls das zweite SoxZ-Cystein mit einem zusätzlichen Schwefel beladen werden. Nach Abgabe des Sulfanschweifels an die SoxZ-Cysteine

könnte das katalytische SoxY-Cys<sub>152</sub> „heraus gedrängt“ werden. Somit befände sich SoxYZ in der hochaffinen R-Form (**Abb. 4.2**) und die „lag“-Phase wäre überwunden. Für diese Eigenschaft müsste die strukturelle Region des katalytischen Cysteins sehr flexibel sein, was durchaus für SoxY aus *P. pantotrophus* bestätigt werden konnte. Das katalytische Cystein befindet sich hier auf einem schwingenden Peptidarm (Quentmeier and Friedrich, 2001; Sauvé et al., 2007; Grabarczyk et al., 2015). Eine Kristallstrukturanalyse könnte bestätigen, ob dies ebenfalls für SoxYZ aus *Alc. vinosum* der Fall ist. Eine vorherige Sulfidinkubation hätte zur Folge, dass die Cysteine von SoxZ bereits persulfuriert vorlägen, wodurch SoxYZ direkt seine R-Form erhalten könnte, in welcher das katalytische Cys<sub>152</sub> ebenfalls frei zugänglich ist. Dies könnte ebenfalls erklären, warum 1,5-I-ADAENS erst nach Sulfidinkubation an SoxY binden konnte.

Um diesen Effekt der Kooperativität für SoxYZ zu bestätigen, sollte eine vollständige Enzymkinetik des Sox Systems mit unterschiedlichen Thiosulfatkonzentrationen durchgeführt werden. Im Falle einer Kooperativität würde bei der Michaelis-Menten-Gleichung ebenfalls ein sigmoider Kurvenverlauf erwartet werden, von welchem sich zwei  $K_M$ -Werte ablesen lassen würden ( $K_T$  :  $K_M$ -Wert im Tense-Zustand;  $K_R$  :  $K_M$ -Wert im Relaxed-Zustand). Mithilfe von anschließenden Linearisierungen in Hill-Diagrammen kann folglich der Hill-Koeffizient  $n_H$  die Kooperativität der Substratbindung eines Enzyms darstellen. Dieser liegt bei positiver Kooperativität zwischen eins und der Anzahl der substratspezifischen Bindungsstellen. Je größer der Hill-Koeffizient ist, desto stärker ist die Kooperativität. (Karlson et al., 1994).

In diesen Versuchen wurde eine Aktivierung artifiziell durch Sulfid erreicht und es bleibt zu klären, ob *in vivo* weitere Proteine für eine Konformationsänderung von SoxYZ von der T- in die R-Form beteiligt sind, welche eine Aktivierung des Proteinkomplexes bewirken könnten. Ein Kandidat für diese Aufgabe ist SoxL, wie im Späteren beschrieben wird.

Für die oben genannten Annahmen sprechen ähnliche Ergebnisse von Grabarczyk and Berks (2017). Hier wurde das rekonstituierte *P. pantotrophus* Sox System näher untersucht, indem zuvor SoxYZ-Konjugate hergestellt und anschließend dem Sox System zugesetzt wurden. Bei Vorhandensein des unkonjugierten SoxYZ wurde auch hier eine „lag“-Phase erhalten und es wurde geschlussfolgert, dass das rekombinante SoxYZ zwar funktionsfähig ist, jedoch eine Art Aktivierung benötigt. Die „lag“-Phase konnte hier überwunden werden, indem das SoxYZ-Thiosulfonat (SoxY(SSO<sub>3</sub>)Z) zugesetzt wurde und somit als das wahrscheinliche Intermediat im Sox System gilt. Weiterhin wurde gezeigt, dass das S-Sulfonat von SoxYZ (SoxY(SO<sub>3</sub>)Z) nicht das eigentliche Intermediat des Sox Systems sein kann, weil hiermit eine Aktivität ausblieb und somit das ursprüngliche Modell des Sox-Systems in *P. pantotrophus* inkorrekt sein muss (**Abb. 4.3 A**). Vor allem aber mit persulfurierten SoxYZ Intermediaten (SoxY(S<sub>n</sub>SO<sub>3</sub>)Z; SoxY(S<sub>n</sub>)Z) konnten die höchsten Aktivitäten des Sox-Systems erzielt und eine „lag“-Phase überwunden werden. Hier wird vermutet, dass eine längere, hydrophobe Schwefelkette dafür sorgen könnte, dass das Substrat besser vom katalytischen Zentrum des SoxB Proteins erkannt wird. Somit wurde ein überarbeitetes Modell erstellt (**Abb. 4.3 B**).



In diesem Zuge soll ebenfalls auf die Ergebnisse mit der heterotetrameren SoxYZ-Form (Sox(YZ)<sub>2</sub>) eingegangen werden. Im Gegensatz zu der inaktiven, heterotetrameren Form von SoxYZ aus *P. pantotrophus* war die heterotetramere Form aus *Alc. vinosum* weiterhin aktiv, doch der Kurvenverlauf ähnelte eher einer schwach ansteigenden Hyperbel und wies keine „lag“-Phase auf. Dies deutet daraufhin, dass sich das SoxY-Cys<sub>152</sub> in einer zugänglicheren Position befand, da die Reaktion direkt ablaufen konnte. Trotzdem scheint sich der Proteinkomplex in einer generell ungünstigen Konformation zu befinden, da die Aktivität geringer ausfiel. In diesem Fall könnte eine alternative, artifizielle Form ausgebildet worden sein. Schematisch gesehen könnten die Cysteine von SoxZ eine Disulfidbrücke ausgebildet haben, wodurch die katalytischen Cysteine von SoxY „verdrängt“ und zugänglich für das Substrat wurden (**Abb. 4.4.; A**). Gegen diese schematische Darstellung sprechen allerdings die Ergebnisse der Gelfiltrationschromatographie mit der SoxY<sub>C152S</sub>Z-Mutante. Hier zeigte sich, dass bei Fehlen des katalytischen Cysteins nur die heterodimere Form erhalten wurde und somit die Ausbildung eines Disulfids zwischen zwei SoxY-Cys<sub>152</sub> eher für das Vorhandensein der heterotetrameren Form verantwortlich ist (**Abb. 4.4.; B**).

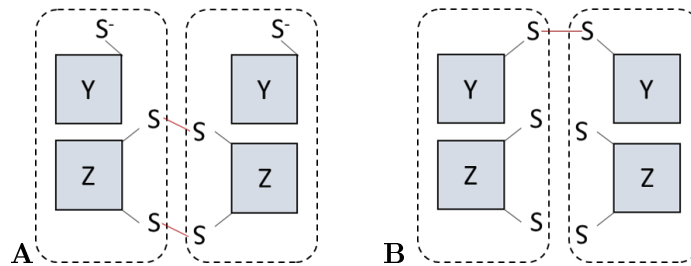


Abbildung 4.4: **Schematische Darstellungen des heterotetrameren SoxYZ Proteinkomplexes.** Cysteine der SoxZ-Einheiten bilden Disulfide und „verdrängen“ dabei das katalytische Cys<sub>152</sub> (**A**). Katalytische Cys<sub>152</sub> zweier SoxY-Einheiten bilden ein Disulfid (**B**).

Trotzdem bleibt dann fraglich, warum diese Form immer noch aktiv war, wohingegen sie bei SoxYZ aus *P. pantotrophus* inaktiv vorlag. Möglich wäre das Vorhandensein beider Kombinationen, welche wahrscheinlich artifiziell gebildet wurden, wobei Quentmeier et al. (2008) anders argumentiert. Hier wird vermutet, dass die heterotetramere Form zur natürlichen Regulierung von SoxYZ gehört und durch eine periplasmatische Thiol-Disulfid Oxidoreduktase (SoxS) reaktiviert wird, indem diese das Disulfid zwischen den beiden katalytischen Cysteinen spaltet. In *Alc. vinosum* scheint aber bereits die heterodimere Form einer Regulierung unterzogen zu werden und es bleibt weiterhin offen, wie genau dies strukturell und funktionell zu erklären ist. Grabarczyk and Berks (2017) argumentieren sogar, dass eine Konformationsänderung nicht vonnöten ist und nur eine Persulfurierung des SoxY-Cys ausreicht, um den Komplex in eine aktivere Form zu überführen. Wie aber bereits erwähnt, wird hier nicht auf das Vorhandensein einer heterotetrameren Form eingegangen.

## 4.5 Die potentielle Schwefeltransferase SoxL und deren Einfluss auf das Sox System

### Hoch konservierte Motive in der Aminosäuresequenz

Das Gen *soxL*, welches für eine annotierte Schwefeltransferase kodiert, konnte als Teil des *soxXAKL* Genclusters ausgemacht werden, womit ein Einfluss dieses periplasmatischen Proteins auf die Funktionalität des Sox System wahrscheinlich ist. Ferner wurden SoxL-Homologe in vielen Vertretern der Chromatiaceae (z.B. *Thiocystis violascens* DSM 198 und *Thiorhodococcus marina*) gefunden, in denen die katalytische Rhodanesedomäne hoch konserviert vorliegt. Die Gene dieser SoxL-Homologe liegen ebenfalls in der gleichen Anordnung stromabwärts von SoxK-Homologen, womit SoxL auch in diesen Vertretern die gleiche Rolle zu spielen scheint.

Die katalytische Rhodanesedomäne (hier: CNGIWC) unterscheidet sich deutlich von dem charakteristischen Motiv einer Thiosulfat:Cyanid-Schwefeltransferase (CRXGX[R/T]), womit die fehlende Aktivität der annotierten Rhodanese zu erklären ist. Weiterhin konnten auch keine Übereinstimmungen mit anderen Rhodanese-Motiven (Bordo and Bork, 2002) gefunden werden, womit die Rhodanese-Domäne von SoxL und die somit verbundene Funktion des Proteins eine Sonderstellung einnimmt. Ein weiteres CXXXC Motiv am N-Terminus (hier: CPPFC), welches ebenfalls hoch konserviert ist, zeigt anhand der Aminosäureabfolge leichte Ähnlichkeiten zum Motiv der Dithiol-Glutaredoxine.

Betrachtet man vorläufig nur die Aminosäureabfolge, zeigt diese Ähnlichkeiten mit einem charakteristischen Motiv (CPFC) für Dithiol-Glutaredoxine (GRX), welche in *Arabidopsis thaliana* gefunden wurden (Lemaire, 2004). Dithiol-Glutaredoxine kommen in allen Glutathion (GSH)- enthaltenden Lebensformen vor und gehören zu der Familie der Thioredoxine, welche auch entscheidend für die Schwefelassimilation sind (Wilson et al., 1961). Sie gehören funktionell zu den Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen, welche Disulfide anderer Proteine reduzieren und selbst durch Glutathion (GSH) im reduzierten Zustand gehalten werden (Abb. 4.5). Das resultierende Glutathion-Disulfid (GS-SG) wird weiterhin über eine Glutathion-Reduktase reduziert, wobei diese Elektronen von NADPH nutzt (Holmgren, 1989; Holmgren et al., 2005).

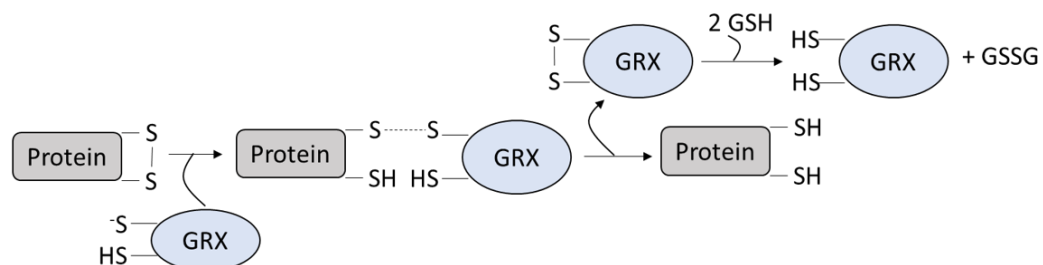


Abbildung 4.5: **Dithiol-Glutaredoxin Aktivitätsmechanismus zur Reduktion von Dithiol-Gruppen.** GRX = Glutaredoxin; GSH = reduziertem Glutathion; GSSG = oxidiertes Glutathion. Cysteinreste in Glutaredoxinproteine sind, abhängig ihres Redoxzustandes, durch SH oder S- gekennzeichnet.

SoxL besitzt allerdings nicht das charakteristische CXXXC Motiv und kann somit nicht eindeutig zu den Thioredoxinen hinzugezählt werden. Trotzdem ist anzumerken, dass im Motiv der Thioredoxine ein hydrophober Bereich vertreten ist, welcher ebenfalls als charakteristisch für Glutaredoxine gilt

(Bushweller et al., 1994). Auch in SoxL liegen zwischen den beiden Cysteinen hydrophobe Aminosäuren und außer dem zusätzlichen Prolin ist die Abfolge der Aminosäuren sehr ähnlich.

### Schwefelbindefähigkeit und Polysulfidbildung

Eine prognostizierte Funktion von SoxL ist den an SoxYZ verbleibenden Sulfanschwefel aufzunehmen und diesen an die Schwefelkugeln weiter zu transferieren. Hierfür war es notwendig, die Schwefel-Bindefähigkeit von SoxL nachzuweisen. Durch die relativ große Masse (ca. 24 kDa) waren Nachweise mittels Massenspektrometer zu dem Zeitpunkt schwierig, aber mit Hilfe einer modifizierten Cyanolyse und dem Einsatz von SoxL-Varianten konnte gezeigt werden, dass fast alle Cysteine (außer Cys<sub>184</sub>) in der Lage sind, ein oder mehrere Schwefelatome zu binden. Als Kontrolle diente eine Mutante, deren Cysteine vollständig gegen Serine ausgetauscht wurden. In diesem Fall konnte kein gebundener Schwefel detektiert werden, wodurch nochmals bestätigt wurde, dass nur die SoxL-Cysteine Cys<sub>68</sub>, Cys<sub>72</sub>, Cys<sub>179</sub> für die Bindung von Schwefel verantwortlich sind.

Die für die Cyanolyse benötigte Sulfidinkubation zeigte außerdem, dass SoxL bzw. diverse SoxL Varianten Polysulfide bildeten. Polysulfide sind molekulare Ketten mit unterschiedlicher Anzahl von Schwefelatomen ( $S_n^{2-}$ ;  $n = 2-8$ ), welche in Lösung eine gelbliche Färbung hinterlassen und im leicht alkalischen Milieu stabil sind (Kamyshny et al., 2004). Sie zeigen einen Absorptionspeak bei 360 nm und können somit leicht mittels UV/Vis-Absorptionsspektrometer detektiert werden (Klimmek et al., 1991). Bei der Sulfid-Inkubation von SoxL zeigte sich ebenfalls eine deutliche Gelbfärbung, die bei höherer Proteinzugabe stärker ausgeprägt war. Das Vorhandensein von Polysulfiden konnte mit der oben dargestellten Methode identifiziert werden. Die Inkubation des Lagerungspuffer (50 mM TrisHCl; pH 7,5) mit Sulfid zeigte nach der gewählten Inkubationszeit (nach 1 Stunde) keine Anwesenheit von Polysulfiden, womit verdeutlicht wurde, dass die Polysulfidbildung allein auf die Zugabe von SoxL zurückzuführen ist. Die Sulfid-Inkubation der periplasmatischen Rhodanese Alvin\_0258 ergab hingegen keine Polysulfide, wobei hier eine leichte Hintergrundreaktion bei der Absorptionsmessung bei 360 nm zu verzeichnen war. Greiner et al. (2013) wiesen ebenfalls Polysulfide nach, wenn Sulfid in hohen Konzentration zum Puffersystem hinzugegeben wurde (55–150 mM in 200mM Tris-HCl, pH 8.0). Für ihre Lösungen verwendeten sie allerdings entgaste Pufferlösungen, welche die Bildung und die Stabilität von Polysulfiden begünstigen, da Polysulfide nur in anaeroben Umgebungen stabil zu lagern sind (Klimmek et al., 1991). Somit wäre es möglich, dass auch in den hier gewählten Experimenten eine spontane Polysulfidbildung ohne Protein aufgetreten ist, welche aber im Verlauf der Inkubationszeit zerfielen, sodass diese bei der Aufnahme des Spektrums nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Obgleich geringer Hintergrundreaktion, zeigte der Lösungsansatz mit SoxL eine deutliche Erhöhung der Absorption bei 360 nm, was für eine hohe Menge an gebildeten Polysulfiden spricht. Diese waren allerdings ebenfalls nicht stabil und zerfielen in Anwesenheit von Sauerstoff zu Schwefel, welcher kolorimetrisch nachgewiesen wurde. Bei Versiegelung der Versuchsplatte mit Folie konnte dieser Vorgang verlangsamt werden, was den Zerfall von Polysulfiden in Anwesenheit von Sauerstoff bekräftigt.

Um zu untersuchen, welche Cysteine für die Bildung der Polysulfide verantwortlich sind, wurden die Experimente mit allen SoxL Varianten wiederholt. Allerdings war die Auswertung schwierig, da sich anhand des Aminosäure-Austausches scheinbar die Konformation und somit die Funktionalität von SoxL änderte. So zeigte sich, dass die Dreifachmutanten SoxL<sub>68</sub>, SoxL<sub>72</sub> und SoxL<sub>184</sub> (angegeben

sind die SoxL Varianten, die das jeweilige Cystein noch besitzen) keine Polysulfide bildeten, wohingegen die Doppelmutante SoxL<sub>68/72</sub> eine hohe Polysulfidbildung aufwies. Generell bildete SoxL sowie die Doppelmutanten die höchsten Polysulfidmengen, wohingegen diese bei den Einfachmutanten wieder geringer ausfielen. Artifizielle Interaktionen zwischen den verbleibenden Cysteinen in den SoxL-Homologen könnten für diesen Umstand eine Erklärung sein.

Die Bildung von Polysulfiden durch SoxL *in vivo* konnte bisher nicht bestätigt werden. Hierfür müssten die hergestellten *Alc. vinosum* Mutanten nochmals in Fermenterversuchen bei konstanten, leicht alkalischen Bedingungen wiederholt und die entnommenen Proben mittels HPLC untersucht werden. Hier könnte sich gegebenenfalls bestätigen, ob in Abwesenheit von SoxL weniger Polysulfide gebildet werden. Falls SoxL auch *in vivo* den Sulfanschwefel von SoxYZ aufnehmen sollte, könnte dieser in Form von längeren Schwefelketten an SoxL verbleiben, welche dann zu den Schwefelkugelpoteinen transferiert werden.

Eine andere Erklärung für die Entstehung von Polysulfiden durch SoxL, in Anwesenheit von Sulfid, wäre eine Verschiebung im Gleichgewicht der Persulfurierung von SoxL. In Anwesenheit von Sulfid können Proteine persulfuriert werden, was auch S-Sulfhydrierung genannt wird und für mehrere Proteine (z.B. Tyrosin-Phosphatase PTP1B) bereits nachgewiesen wurde (Krishnan et al., 2011). In dieser Arbeit konnte dies ebenfalls für SoxYZ mittels 1,5-I-ADAENS-Behandlung gezeigt werden. Bei hoher Konzentration des Reduktionsmittels (hier: Sulfid) kann sich allerdings, abhängig von der Natur der persulfurierten Cysteine, das Gleichgewicht der Reaktion ändern (Dóka et al., 2016). Folgende Gleichung soll dies veranschaulichen:



Mit dem Modell-Disulfid DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) wurde dieses Phänomen ebenfalls verdeutlicht. Nach anfänglicher Persulfurierung und damit verbundener Reduktion des Disulfids zu TNB-Persulfid wurde es in einer weiteren Reaktion weiter reduziert, wodurch TNB und Polysulfide entstanden sind (Vasas et al., 2015). Das Gleichgewicht hatte sich also durch die hohe Sulfidkonzentration auf die rechte Seite verlagert. Im Gegensatz dazu, zeigte das Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN) eine Verlagerung des Gleichgewichtes auf die linke Seite (Greiner et al., 2013). Somit wäre es möglich, dass persulfuriertes SoxL durch die hohe Konzentration von Sulfid erneut reduziert wird, wodurch die Polysulfidentstehung zu erklären wäre. Strukturelle Unterschiede in Alvin\_0258 bzw. SoxYZ könnten wiederum das Gleichgewicht der Reaktion auf die linke Seite verlagern, womit eine Polysulfidbildung ausgeschlossen wird, was auch in den hier beschriebenen Versuchen gezeigt werden konnte.

### Strukturelle Eigenschaften

In den hier beschriebenen Experimenten wurde deutlich, dass SoxL in Anwesenheit von Sulfid persulfuriert wird und wahrscheinlich mehr als nur ein zusätzliches Schwefelatom aufnimmt. Genau wie bei SoxYZ scheint Sulfid allerdings auch einen Einfluss auf die Konformation des Proteins zu haben, wie die Versuche mit 1,5-I-ADAENS verdeutlichten. Ohne Sulfid war SoxL in der Lage das Thiol-reaktive Reagenz zu binden, was sich in einer Fluoreszenz der Proteinbande unter UV-Licht zeigte. Inkubierte man aber SoxL mit Sulfid war SoxL nicht mehr in der Lage 1,5-I-ADAENS zu

binden, vermutlich durch die Ausbildung von Schwefelbrücken oder Disulfide zwischen Cys<sub>68</sub> und Cys<sub>72</sub> bzw. Cys<sub>179</sub> und Cys<sub>184</sub>. Um diesen Umstand zu bestätigen, wurden die Versuche mit allen SoxL Varianten wiederholt. Die einzelnen Ergebnisse stammen aus dieser Arbeit sowie aus der Bachelorarbeit von C. Domin (2013) und werden zur besseren Veranschaulichung hier nochmals zusammengetragen (**Abb. 4.6.-4.8.**).

Bei der Betrachtung der Dreifachmutanten und somit der einzelnen Cysteine, können einige vorherige Ergebnisse bestätigt werden. Wie zuvor gezeigt, ist Cys<sub>184</sub> nicht in der Lage Schwefel zu binden, liegt aber für 1,5-I-ADAENS in einem zugänglichen Zustand vor. Somit ist Cys<sub>184</sub> nicht bei der Bindung von zusätzlichen Schwefelatomen beteiligt. Im Gegensatz dazu, scheint sich Cys<sub>179</sub> verborgen im Protein zu befinden, da 1,5-I-ADAENS nicht in der Lage war, an diesem Cystein zu binden. Somit konnte nur durch die Cyanolyse-Experimente bestätigt werden, dass Cys<sub>179</sub> zusätzliche Schwefelatome bindet (**Abb. 4.6.**).

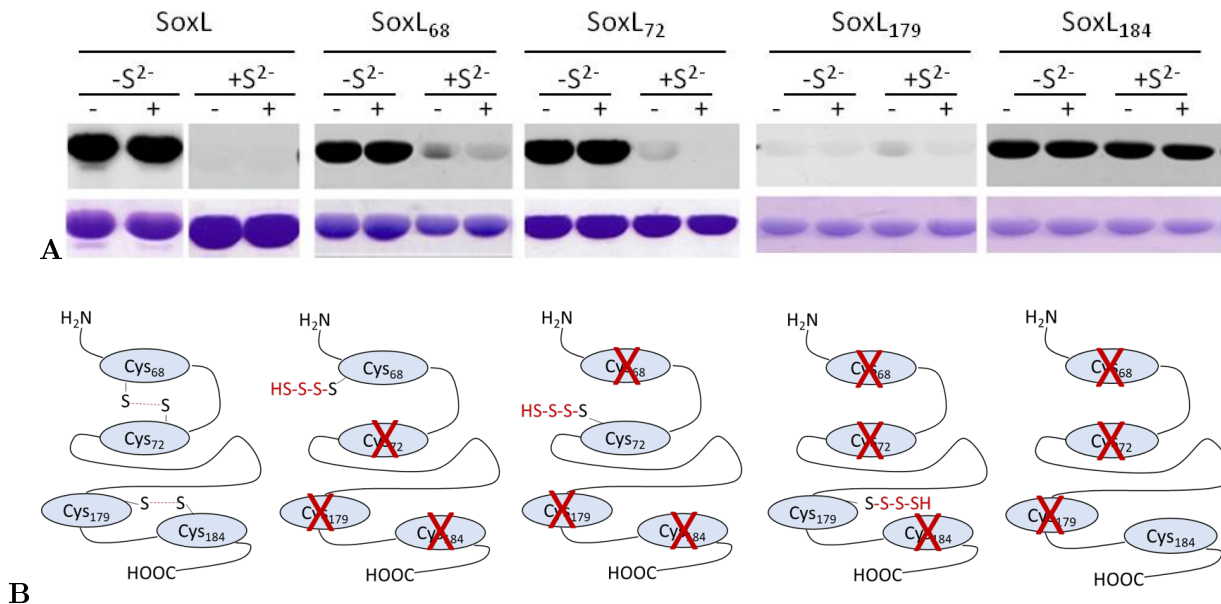


Abbildung 4.6: **Ergebnisse der 1,5-I-ADAENS Experimente mit SoxL bzw. SoxL Dreifachmutanten ((Domin, 2013) & Diese Arbeit).** **A:** Ergebnisse der 1,5-I-ADAENS Experimente mit SoxL bzw. SoxL Dreifachmutanten; 10 µg Protein nach 1,5-I-ADAENS Behandlung wurden auf eine 15%ige SDS-Page gegeben. -S<sup>2-</sup>: keine Sulfidvorbehandlung; +S<sup>2-</sup>: mit Sulfidvorbehandlung; +/-: DTT Zugabe nach 1,5-I-ADAENS Behandlung. Visualisierung mittels UV-Licht (obere Banden) und Coomassie-Färbung (untere Banden). **B:** Schematische Darstellung der Strukturänderungen innerhalb von SoxL bzw. der SoxL Dreifachmutanten nach Sulfidbehandlung.

Auch die Cysteine Cys<sub>68</sub> bzw. Cys<sub>72</sub> liegen für 1,5-I-ADAENS zugänglich vor, solange diese SoxL Varianten nicht mit Sulfid vorinkubiert wurden. Nach Bindung mehrerer Schwefelatome wurde die Zugänglichkeit, wahrscheinlich durch sterische Behinderungen, für das Reagenz deutlich geringer. Das Vorhandensein von zusätzlich gebundenen Schwefelatomen konnte hier ebenfalls bestätigt werden, da nach Einsatz von Reduktionsmittel (DTT) die Fluoreszenz der Proteinbanden weitestgehend verringert wurde (**Abb. 4.6.**).

Die Schwefelbrücken innerhalb von SoxL (nach Sulfidinkubation) konnten über die Analyse der Doppelmутanten bestätigt werden. So zeigte sich, dass SoxL<sub>68/72</sub> bzw. SoxL<sub>179/184</sub> nicht in der Lage



waren, 1,5-I-ADAENS zu binden. Diese Behinderung konnte durch nachträgliche DTT-Behandlung wieder aufgehoben werden. Im Gegensatz dazu, wurde zwischen Cys<sub>68</sub> und Cys<sub>179</sub> keine Schwefelbrücken ausgebildet (**Abb. 4.7**).

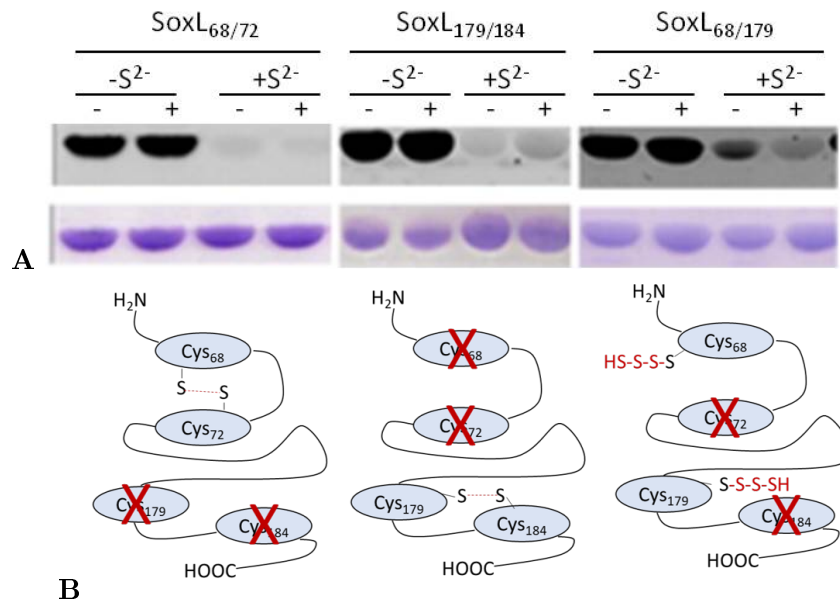


Abbildung 4.7: **Ergebnisse der 1,5-I-ADAENS Experimente mit SoxL Doppelmutanten I ((Domin, 2013) & Diese Arbeit).** **A:** Ergebnisse der 1,5-I-ADAENS Experimente mit SoxL Doppelmutanten; 10 µg Protein nach 1,5-I-ADAENS Behandlung wurden auf eine 15%ige SDS-Page gegeben. -S<sup>2-</sup>: keine Sulfidvorbehandlung; +S<sup>2-</sup>: mit Sulfidvorbehandlung; +/-: DTT Zugabe nach 1,5-I-ADAENS Behandlung. Visualisierung mittels UV-Licht (obere Banden) und Coomassie-Färbung (untere Banden). **B:** Schematische Darstellung der Strukturänderungen innerhalb von SoxL bzw. der SoxL Dreifachmutanten nach Sulfidbehandlung.

Als die Experimente mit der Mutante SoxL<sub>68/184</sub> durchgeführt wurden, tauchten auf der SDS-Page teilweise zwei unterschiedliche Banden auf. Die höhere Bande besitzt wahrscheinlich eine offenere Struktur, in welcher Cys<sub>68</sub> weiterhin Schwefelatome binden kann, die nach DTT-Behandlung geringfügig abgespalten werden (**Abb. 4.8.; links**). Die kleinere Bande könnte darauf beruhen, dass sich hier artifizielle Schwefelbrücken oder Disulfidbindungen zwischen Cys<sub>68</sub> und Cys<sub>184</sub> ausgebildet haben, welche wahrscheinlich eine kompaktere Form des Proteins hervorrufen, womit der Banden-Shift auf der SDS-Page zu erklären wäre. Hier sind, im Gegensatz zu der offeneren Form, die Cysteine strukturell nicht mehr zugänglich, da 1,5-I-ADAENS nicht in Lage war, an die Cysteine zu binden. Der gleiche Effekt wurde mit SoxL<sub>72/184</sub> und in leichter Form auch mit SoxL<sub>72/179</sub> erhalten (**Abb. 4.8.**). Dies zeigt, dass die Cysteine in SoxL dazu geeignet sind miteinander zu reagieren und wahrscheinlich in Abwesenheit bestimmter Cysteine artifizielle Bindungen suchen. Zum Teil werden diese kompakteren Formen auch ohne Sulfid ausgebildet (SoxL WT, SoxL<sub>72/184</sub>), was vor allem auch bei den Einfachmutanten zu sehen ist.

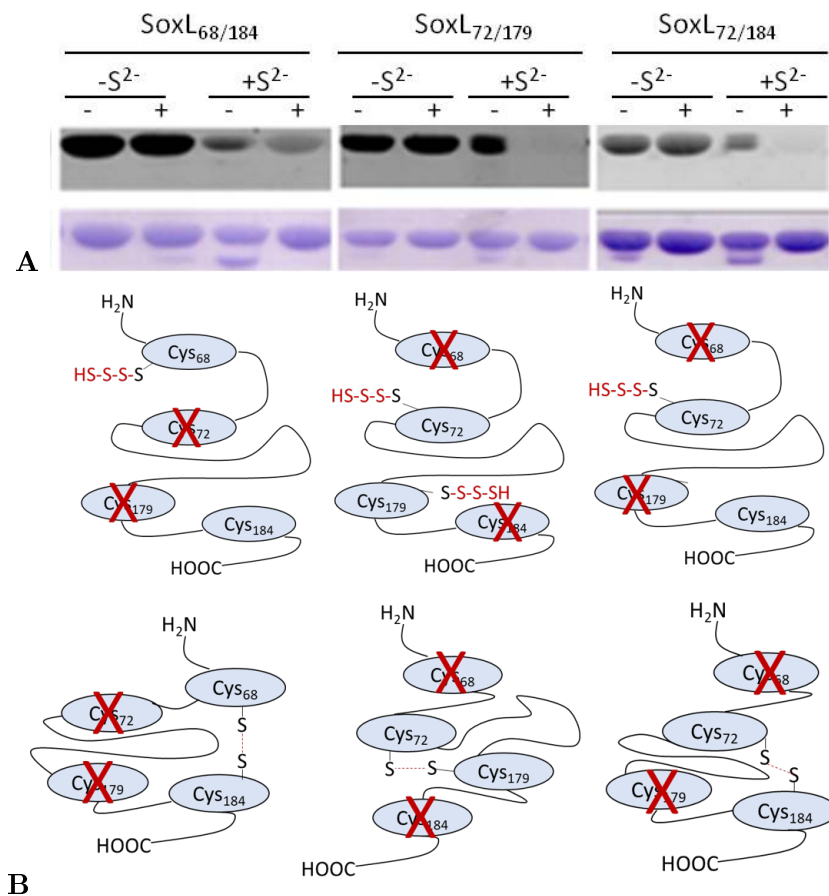


Abbildung 4.8: **Ergebnisse der 1,5-I-ADAENS Experimente mit SoxL Doppelmutanten II ((Domin, 2013) & Diese Arbeit).** **A:** Ergebnisse der 1,5-I-ADAENS Experimente mit SoxL Doppelmutanten; 10 µg Protein nach 1,5-I-ADAENS Behandlung wurden auf eine 15%ige SDS-Page gegeben. -S<sup>2-</sup>: keine Sulfidvorbehandlung; +S<sup>2-</sup>: mit Sulfidvorbehandlung; +/-: DTT Zugabe nach 1,5-I-ADAENS Behandlung. Visualisierung mittels UV-Licht (obere Banden) und Coomassie-Färbung (untere Banden). **B:** Schematische Darstellung der Strukturänderungen innerhalb der SoxL Doppelmutanten nach Sulfidbehandlung.

Bei den Einfachmutanten zeigte sich, dass die Anwesenheit von Cys<sub>179</sub> die Ausbildung einer Schwefelbrücke zwischen Cys<sub>68</sub> und Cys<sub>72</sub>, auch ohne Sulfidinkubation, zu fördern scheint. Im Gegensatz dazu, besitzt Cys<sub>184</sub> nicht diese Eigenschaft. Die kompaktere, kleinere Bande tauchte erneut auf, wenn Cys<sub>179</sub> und Cys<sub>184</sub> eine Schwefelbrücke ausbildeten, während ein weiteres Cys<sub>68</sub> bzw. Cys<sub>72</sub> vorhanden war (**Abb. 4.9**).

Diese kompakteren Formen können mittels DTT, aber nicht Sulfid, gelöst werden. Dies bestätigt, genauso wie bei SoxYZ, dass die Anwesenheit von Sulfid nicht nur eine Persulfurierung der Cysteine verursacht, sondern ebenso die Konformation des Proteins verändert. Im Falle des nicht mutierten SoxLs wird die bereits vorhandene, kompaktere Form durch Sulfid gelöst.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Schwefelbrückenbildungen oder Disulfidbindungen zwischen den Cys<sub>68</sub> und Cys<sub>72</sub> bzw. Cys<sub>179</sub> und Cys<sub>184</sub> nachgewiesen werden konnten, welche durch Sulfid induziert wurden und somit die Zugänglichkeit der Cysteine veränderten. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass alle Cysteine (außer Cys<sub>184</sub>) in der Lage sind, zusätzlichen Schwefel zu binden und sich Cys<sub>179</sub> in einer sterisch unzugänglichen Position befindet. Ferner scheinen die Cysteine sehr

reaktiv zu sein, da sie Schwefelbrücken- oder Disulfidbindungen ausbilden, wenn ihr natürlicher Reaktionspartner nicht vorhanden ist. Somit können z.B. auch Bindungen zwischen Cys<sub>72</sub> und Cys<sub>184</sub> ausgebildet werden.

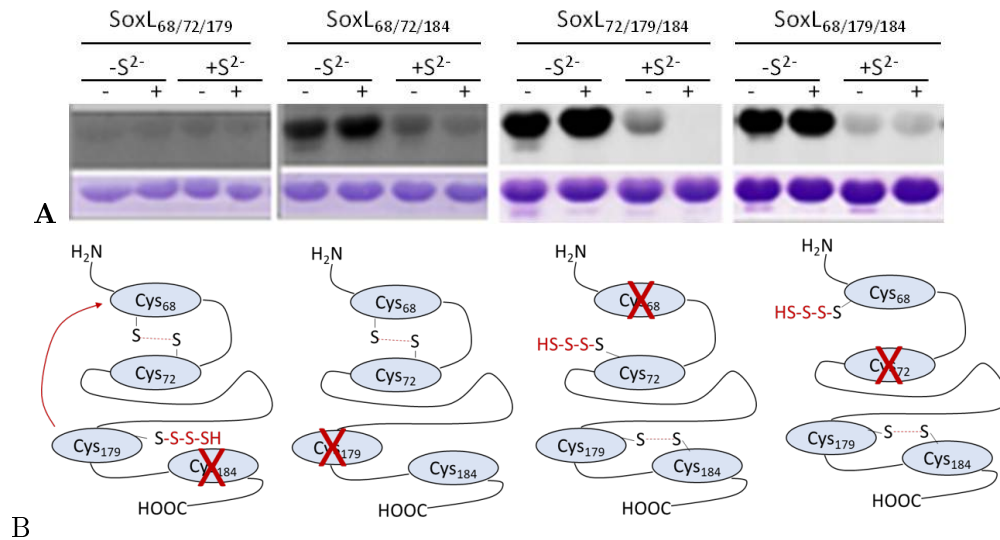


Abbildung 4.9: **Ergebnisse der 1,5-I-ADAENS Experimente mit SoxL Einfachmutanten ((Domin, 2013) & Diese Arbeit).** **A:** Ergebnisse der 1,5-I-ADAENS Experimente mit SoxL Einfachmutanten; 10 µg Protein nach 1,5-I-ADAENS Behandlung wurden auf eine 15%ige SDS-Page gegeben. -S<sup>2-</sup>: keine Sulfidvorbehandlung; +S<sup>2-</sup>: mit Sulfidvorbehandlung; +/-: DTT Zugabe nach 1,5-I-ADAENS Behandlung. Visualisierung mittels UV-Licht (obere Banden) und Coomassie-Färbung (untere Banden). **B:** Schematische Darstellung der Strukturänderungen innerhalb der SoxL Einfachmutanten nach Sulfidbehandlung.

Die Ausbildung von Schwefelbrücken oder Disulfide zwischen spezifischen Cysteinen innerhalb von SoxL wurde unter aeroben Bedingungen festgestellt. *Alc. vinosum* vermehrt sich allerdings unter anaeroben Bedingungen, womit die Ausbildung dieser Struktur ebenfalls unter den natürlichen Bedingungen zu überprüfen galt. Somit erfolgte in einem weiteren Versuchsansatz die Sulfidinkubation, als auch die anschließende 1,5-I-ADAENS Behandlung, unter anaeroben Bedingungen. Hierbei zeigte sich, dass SoxL ebenfalls unter anaeroben Bedingungen Schwefelbrücken ausbildete.

Ähnliche Ergebnisse konnten für eine menschliche Superoxid-Dismutase (SOD1) erhalten werden. Sogar unter anaeroben Bedingungen bildete SOD1 eine Heptasulfan-Brücke zwischen zwei Cysteinen aus (Cys-S<sub>5</sub>-Cys), wodurch mittels Kristallstrukturanalyse eine dimere Form gefunden werden konnte (You et al., 2010). Diese Polyschwefel-Bindungen wurden ebenfalls für andere Enzyme gefunden, welche eine wesentliche Rolle während des katalytischen Prozesses spielen (Calabrese et al., 1975; Hylin and Wood, 1959). Hier ist allerdings nicht klar, ob diese Formierungen ebenfalls unter anaeroben Bedingungen entstanden sind.

Genauere strukturelle Eigenschaften könnten über den Erhalt einer Kristallstruktur analysiert werden. Hierbei sollte sowohl eine Kristallstruktur mit und ohne vorherige Sulfidinkubation erhalten werden, damit der Einfluss durch Sulfid und die damit verbundene Konformationsänderung näher untersucht werden können. Vorbereitungen von SoxL wurden bereits durchgeführt, um eine hohe Reinheit des Proteins zu erhalten. Leider konnten bisweilen keine Kristalle erhalten werden.

### Die Interaktion zwischen SoxYZ und SoxL

Die potentielle Schwefeltransferase könnte, wie schon erwähnt, die Funktion besitzen, SoxYZ zu regenerieren. Hierzu würde SoxL den von SoxYZ gebundenen Sulfanschwefel aufnehmen und wahrscheinlich an die Schwefelkugeln transferieren. Für diese Hypothese war die Überprüfung einer möglichen Interaktion zwischen SoxL und SoxYZ wesentlich. Mittels Präzipitationsstudien konnte eine Komplexbildung zwischen SoxYZ und SoxL nachgewiesen werden, indem SoxL (ohne StrepTag®) nur in einer hohen Menge von der verwendeten StrepTactin®-Säule eluierte, wenn das Protein zuvor mit SoxYZ (mit StrepTag®) inkubiert und zusammen auf die Säule gegeben wurde. Der Kontrollversuch (ohne SoxYZ) zeigte wiederum, dass SoxL bereits in der Durchlauf- bzw. Waschfraktion vorhanden und ohne SoxYZ nicht befähigt war, an die Säule zu binden. Weiterhin fiel der Erhalt einer weiteren Bande auf, die eine Masse von ca. 17 kDa besaß. Diese passt rechnerisch zwar nicht auf mögliche SoxYZ Identitäten, da diese eine viel höhere Masse besitzen müssten (z.B. Y-Y: 25,6 kDa), tauchte aber nur in Anwesenheit von SoxL auf. Die Interaktion beider Proteine könnte eine strukturelle Modifikation innerhalb von SoxY oder SoxZ verursachen, wodurch es zu einer Veränderung im Laufverhalten von SoxY bzw. SoxZ kommen könnte.

Interaktionsstudien mittels nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen lieferten weitere Ergebnisse einer möglichen Komplexbildung. SoxL schien eine Bandenverlagerung von SoxYZ zu verursachen, wodurch die untere Bande in die höher laufende Form umgewandelt wurde (Welte et al. (2009) & Diese Arbeit). Hierfür könnte es mehrere Erklärungen geben. SoxL könnte zum einen verhelfen, die heterodimere Form in die heterotetrameren Form zu verlagern, wobei wahrscheinlich Schwefelbrückenbindungen oder Disulfidbindungen ausgebildet werden. Zum anderen könnte SoxL, wie oben beschrieben, die Struktur auf eine noch unbekannte Weise verändern, womit SoxYZ ein anderes Laufverhalten erhalten würde. Eine weitere Erklärung wäre die Ausbildung eines Komplexes zwischen SoxL und SoxYZ. Dies könnte mit dem Fehlen der SoxL Bande im nicht denaturierenden Polyacrylamidgel erklärt werden. Allerdings wäre hier eine deutlich höhere Bande erwartet worden, wobei auch ein solcher Komplex ein anderes Laufverhalten aufweisen könnte. Dies würde allerdings voraussetzen, dass SoxL in Anwesenheit von SoxYZ, in eine sehr kompakte Form überführt werden würde.

Um diese strukturellen Eigenschaften weiter zu klären, sollten die Proben zunächst einzeln mit Sulfid „aktiviert“, dialysiert und dann gemeinsam inkubiert und anschließend auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel gegeben werden. Dieser Vorgang könnte weiterhin variiert werden (z.B. SoxL „aktiviert“ mit SoxYZ), um eine Analyse der strukturellen Veränderungen zu ermöglichen, vor allem nach Sulfid-induzierter „Aktivierung“ der Proteine. Weiterhin könnten die katalytischen Ergebnisse des Sox Systems in Anwesenheit mit SoxL, welche im Späteren diskutiert werden, dadurch näher beleuchtet werden.

Zusammenfassend konnte mit den beschriebenen Versuchen gezeigt werden, dass es zu einer Interaktion zwischen SoxYZ und SoxL kommt, auch wenn die genaue Struktur dieser Interaktion nicht vollends analysiert werden konnte.

Mittels 1,5-I-ADAEANS wurde weiterhin deutlich, dass SoxL in der Lage ist, den gebundenen Sulfanschwefel von SoxYZ aufzunehmen. Dieser Vorgang scheint allerdings durch eine lange Inkubationszeit begünstigt zu sein (Domin, 2013). Wird diese nämlich verkürzt, fällt der Transfer deutlich

geringer aus, womit dieser Schwefeltransfer eine unspezifische, erzwungene Interaktion darstellen könnte. Dies könnten die nachfolgenden Experimente mit der Verwendung von SoxL Mutanten bestätigen. Hier konnte bei allen SoxL Mutanten (außer SoxL<sub>-Cys</sub>) ein Schwefeltransfer, ausgehend von SoxYZ, nachgewiesen werden. Ebenfalls die Mutante SoxL<sub>184</sub> schien Schwefel von SoxYZ zu übernehmen, obwohl in mehreren Versuchen bereits gezeigt werden konnte, dass Cys<sub>184</sub> nicht persulfuriert werden kann. Entweder erfolgt, wie bereits beschrieben, diese Reaktion unspezifisch oder diese Mutante kann nur von SoxYZ Sulfanschwefel übernehmen, wohingegen eine Inkubation mit Sulfid keine Persulfurierung verursacht. Weitere Analysen müssten durchgeführt werden, um sicher zu sein, dass es sich hierbei um eine spezifische Reaktion handelt.

Um auszuschließen, dass die Persulfurierung nicht durch überschüssiges Sulfid im Inkubationspuffer zustande kam, wurde eine Pufferkontrolle durchgeführt. Hierbei wurde Puffer, ohne Protein, mit der gleichen Menge Sulfid versetzt, eine Stunde lang inkubiert und anschließend über Nacht dialysiert. Statt mit SoxYZ wurden nun SoxL, als auch einige SoxL Mutanten, mit diesem Puffer inkubiert und danach mit 1,5-I-ADAENS behandelt. Hierbei zeigte sich, dass der Puffer keinerlei Auswirkung auf SoxL besaß. Demnach geht die Schwefelaufnahme an SoxL ausschließlich vom aktivierten SoxYZ und nicht von Sulfid-Rückständen im Puffer aus.

Eine entgegengesetzt verlaufende Reaktion wurde nicht beobachtet. So konnte SoxL nur von aktiviertem SoxYZ persulfuriert werden, aber aktiviertes SoxL schien keinen Effekt auf SoxYZ zu haben, solange nur die 1,5-I-ADAENS Assays betrachtet werden. Reaktionsverläufe im Sox Assay zeigten wiederum andere Ergebnisse.

### Der katalytische Einfluss von SoxL auf das Sox System

In Anwesenheit von SoxL wird die zuvor beschriebene „lag“-Phase des Sox Systems, welche wahrscheinlich durch strukturelle Eigenschaften von SoxYZ zustande kommt, deutlich verlängert. Höhere Konzentrationen von SoxL verstärken diesen Effekt weiter. Trotz dieser Beobachtung wurde aber auch die Aktivitätsphase des Sox-Systems, durch Zugabe von SoxL, erhöht. Dies bedeutet, dass das Sox-System durch SoxL zwar zunächst gehemmt wird, die Reaktion in der Aktivitätsphase aber deutlich schneller abläuft, sobald diese Hemmung überwunden wird. Geht man erneut von der Kooperationstheorie für SoxYZ aus, so scheint unpersulfuriertes SoxL die Ausbildung der T-Form zu verstärken.

Im Gegensatz dazu, verkürzt aktiviertes SoxL die „lag“-Phase, womit SoxYZ schneller in die R-Form überführt wird. Da Konzentrationssteigerungen von SoxL diesen Effekt ebenfalls verstärken, scheint es sich hierbei um einen katalytischen Effekt zu handeln, welcher durch SoxL verursacht wird. Somit wird erneut gezeigt, dass SoxL und SoxYZ miteinander interagieren.

Geht man von den Ergebnissen von Grabarczyk and Berks (2017) aus, könnte dieser Umstand folgendermaßen erklärt werden: SoxYZ befindet sich in einem aktiveren Zustand, wenn es zusätzliche Sulfan-Schwefelatome trägt (SoxY(S<sub>n</sub>)Z). Es konnte gezeigt werden, dass die „lag“-Phase überwunden wurde, wenn sich SoxYZ in diesem Zustand befand. Wird nun SoxL hinzugegeben, welches Schwefelatome von SoxYZ aufnimmt, gelangt SoxYZ wieder in seine inaktivere Form und die „lag“-Phase wird erhalten. Fügt man allerdings mit Sulfid aktiviertes SoxL zum Sox-System bei, könnte SoxYZ von SoxL persulfuriert werden, womit die „lag“-Phase überwunden wäre sowie die Aktivität des Systems gesteigert werden könnte. Für Letzteres konnte aber in dieser Arbeit kein Nachweis

erbracht werden, denn die 1,5-I-ADAENS Experimente gaben keinen Hinweis darauf, dass SoxL in der Lage ist, SoxYZ zu persulfurieren.

Auch andere Ergebnisse sprechen gegen diese These. So kann zwar das Vorhandensein der „lag“-Phase auf diese Weise erklärt werden, allerdings nicht, warum sie sich in Anwesenheit von SoxL sogar verlängert. Ebenfalls die Aktivitätssteigerung des Systems, nachdem die „lag“-Phase überwunden wurde, lässt sich mit dieser nicht erklären. Auch der Übergang von der heterodimeren in die heterotetrameren SoxYZ-Form, die bei den Interaktionsstudien beobachtet werden konnte, kann mit dieser These nicht gedeutet werden. Somit scheint diese Interaktion nicht ausschließlich auf einen Schwefeltransfer zu beruhen, sondern deutet auf eine strukturelle Inaktivierung bzw. Aktivierung von SoxYZ durch SoxL hin.

Beim Zusammenführen aller Ergebnisse, können zu diesem Zeitpunkt folgende Vorgänge nur vermutet werden, die in **Abbildung 4.10** verdeutlicht werden sollen.

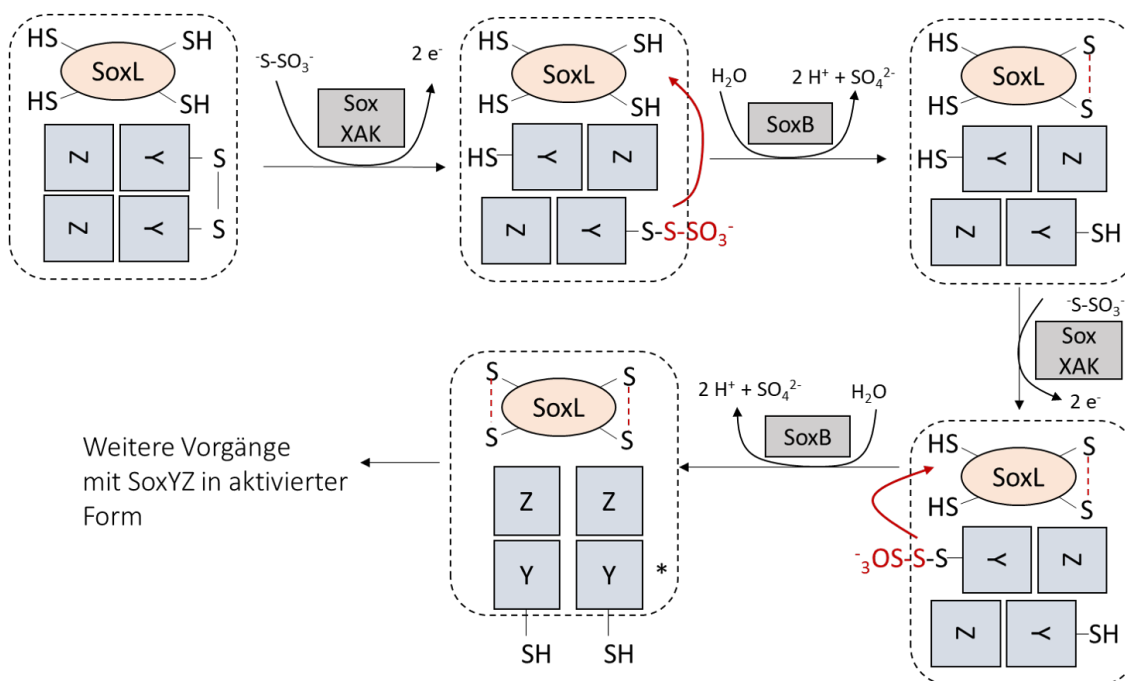


Abbildung 4.10: **Schematische Darstellung der Komplexbildung zwischen SoxL und SoxYZ während der Ausbildung der „lag“-Phase.** SoxL bildet zunächst einen Komplex mit SoxYZ und „blockiert“ dessen Struktur. Nach Bindung des Substrates durch SoxYZ, wird der Sulfanschwefel an die Cysteine von SoxL weiter gegeben, womit sich dessen Konformation im weiteren Verlauf ebenfalls ändert. Hier könnten Schwefelbrücken zwischen den Cysteinen ausgebildet werden, wodurch SoxL eine kompaktere Struktur erhält. SoxL verbleibt in dieser Konformation weiterhin an SoxYZ, welches aber in die aktivierte Form (\*) überführt wird.

Durch die Interaktionsstudien wurde gezeigt, dass SoxL die Ausbildung der heterotetrameren SoxYZ-Form begünstigt und beide Proteine wahrscheinlich zwischenzeitlich einen Komplex ausbilden. Durch einen noch unbekanntem Mechanismus festigt SoxL die Ausbildung der inaktiveren Form von SoxYZ, womit die „lag“-Phase verlängert wird. Vermutlich könnte die Ausbildung eines Disulfids zwischen zwei SoxY-Cysteinen hierfür verantwortlich sein, welche auch die Ausbildung der heterotetrameren Form erklären würde. Durch das Vorhandensein von SoxXAK könnte nun ein SoxYZ

oxidativ mit Thiosulfat beladen werden, wodurch die heterotetramere Form aufgehoben wird. Bei der anschließenden hydrolytischen Spaltung des Sulfates durch SoxB könnte nun der am SoxYZ verbleibende Sulfanschwefel an SoxL weitergegeben werden, wie es auch bei den 1,5-I-ADAENS-Studien gezeigt werden konnte. Somit würden beim Ablauf weiterer Zyklen, Disulfide bzw. Schwefelbrücken innerhalb von SoxL entstehen. Dies würde ebenfalls den Umstand erklären, dass SoxL nicht mehr in der Lage war, 1,5-I-ADAENS zu binden, wenn es Sulfanschwefel von SoxYZ aufgenommen hat. Weiterhin ist denkbar, dass SoxL den SoxYZ-Komplex nun in einen aktiveren Zustand versetzt, womit die erhöhten Aktivitäten begründet werden könnten. Wie genau dieser Mechanismus erfolgt, ist bisher unklar (**Abb. 10**). Die einfachste Erklärung wäre, wie Grabarczyk and Berks (2017) für das *P. pantotrophus* Sox-System zeigen konnte, dass SoxYZ nun in der Lage ist, SoxY(S<sub>n</sub>)Z Intermediate auszubilden, die für eine höhere Aktivität des gesamten Systems sorgen könnten. Hierbei bleibt fraglich, ob SoxL weiterhin Sulfan-Schwefel von SoxYZ aufnimmt, um es zu regenerieren, wie es bei *P. pantotrophus* mit SoxCD der Fall ist. Weiterhin denkbar wäre nur eine Beteiligung an der hier vorgestellten Initiierungs-Phase, um eine Regulation von SoxYZ zu ermöglichen. Weiterhin wurde gezeigt, dass mit Sulfid aktiviertes SoxL die „lag“-Phase deutlich minimierte und eine weitere Aktivitätssteigerung des Sox Systems zu verzeichnen war. Vermutlich befand sich SoxL somit bereits in einem Zustand, um SoxYZ in eine aktivere Form zu überführen.

Diese Ergebnisse erfolgten nur mit der heterodimeren Form von SoxYZ. Wenn SoxL zusammen mit der heterotetrameren Form von SoxYZ in das Sox Assay gegeben wurde, konnte weder eine Verlängerung der „lag“-Phase noch eine deutliche Aktivitätssteigerung verzeichnet werden. Dies zeigt, dass SoxYZ wahrscheinlich *in vivo* in der heterodimeren Form vorkommt, mit welcher SoxL interagieren kann. Um dies zu bestätigen, sollten nach Inkubation der unterschiedlichen SoxYZ-Formen mit SoxL, die Proteine auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel gegeben werden, um die mögliche Interaktionsform von SoxYZ für SoxL zu identifizieren.

Mit diesen Ergebnissen wird ein weiterer Punkt deutlich. Im Sox System von *P. pantotrophus* wurde, wie bereits erwähnt, ebenfalls eine heterotetramere Form von SoxYZ detektiert, welche durch eine Bindung zwischen den katalytischen Cysteinen zweier SoxY Einheiten zustande kommt. Hier wird vermutet, dass eine periplasmatische Thiol-Disulfid Oxidoreduktase (SoxS) diese Disulfidbindung spaltet und somit SoxYZ reaktiviert und in seine heterodimere Form zurückgeführt wird (Quentmeier et al., 2008). Diese Funktion kann für SoxL aus *Al. vinosum* ausgeschlossen werden, da eine Interaktion zwischen der heterotetrameren Form von SoxYZ und SoxL offensichtlich nicht vorhanden ist.

Es ist zu beachten, dass die hier aufgezeigten Darstellungen rein spekulativ sind und es weitere Experimente erfordert, den komplexen, katalytischen als auch strukturellen Vorgang bei der Interaktion zwischen SoxL und SoxYZ vollständig zu analysieren.

Durch die Experimente mit 1,5-I-ADAENS konnte gezeigt werden, dass SoxYZ den gebundenen Sulfanschwefel an alle Cysteine in SoxL übertragen konnte. Trotzdem blieb fraglich, ob auch jedes Cystein an der katalytischen Interaktion zwischen SoxL und SoxYZ beteiligt ist. Hierfür wurden alle hergestellten SoxL Mutanten zum Sox Assay gegeben und mit SoxL verglichen. Um die Reaktionsbedingungen so gleich wie möglich zu halten, wurden Einzel-, Doppel- bzw. Dreifachmutanten gleichzeitig untersucht, indem eine Multititerplatte verwendet wurde, in deren Wells zunächst die

grundlegenden Bestandteile des Sox Assays (Puffer, SoxXAK, SoxB, SoxYZ, Cytochrome *c*, Thio-sulfat) vorgelegt wurden. Erst bei der gleichzeitigen Zugabe der SoxL Mutanten mittels Multipette wurden die Reaktionen gestartet und sofort in ein Plattenlesegerät gegeben, um die Reaktionsverläufe zu messen. Hierbei wurde auch darauf geachtet, dass mindestens zwei Ansätze für eine SoxL Mutante vorlagen. Die Analyse der erhaltenen Reaktionsverläufe war allerdings schwierig, da die Mutanten nicht eindeutige Ergebnisse darüber lieferten, welche Cysteine für die Verlängerung der „lag“-Phase verantwortlich sind. Nur SoxL verlängerte die „lag“-Phase auf ungefähr 45 Minuten. Bei keiner Mutante war diese Verlängerung so deutlich ausgeprägt, wie bei dem nicht mutierten SoxL. Trotzdem war auffällig, dass SoxL Mutanten mit jeweils nur einem funktionellen Cystein kaum oder gar nicht mehr in der Lage waren, die „lag“-Phase zu erhöhen. Dies könnte die Vermutung bestätigen, dass nicht nur eine strukturelle Behinderung durch SoxL an SoxYZ für dieses Phänomen verantwortlich ist, sondern ebenfalls die Cysteine in SoxL. Dies wurde durch SoxL<sub>-Cys</sub> bekräftigt, da auch hier keine „lag“-Phasen Erhöhung erhalten wurde. Diese Mutanten waren also kaum noch in der Lage, eine mögliche inaktive Form von SoxYZ für längere Zeit aufrecht zu erhalten. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass bei Mutanten mit vorhandenem Cys<sub>68</sub> eine Verlängerung der „lag“-Phase begünstigten (SoxL<sub>68/184</sub>, SoxL<sub>68/179</sub>, SoxL<sub>68/179/184</sub>, SoxL<sub>68/72/184</sub>). Im Gegensatz dazu, schienen Mutanten mit vorhandenem Cys<sub>72</sub> diesen Effekt kaum noch zu besitzen (SoxL<sub>68/72</sub>, SoxL<sub>72/184</sub>, SoxL<sub>72/179</sub>, SoxL<sub>72/179/184</sub>, SoxL<sub>68/72/179</sub>). Trotz dieser Tendenzen ist zu beachten, dass es hier auch ein paar Ausnahmen gibt.

Dieses Bild ändert sich erneut nach Aktivierung der SoxL Mutanten mittels Sulfid. In diesem Fall waren vorwiegend die SoxL Mutanten, welche die C-terminalen Cysteine (Cys<sub>179</sub>, Cys<sub>184</sub>) besaßen, in der Lage, die „lag“-Phase zu reduzieren. Auch das Vorhandensein des Cys<sub>72</sub> schien diese Erniedrigung zu begünstigen. Im Gegensatz dazu, waren die meisten SoxL Mutanten mit vorhandenem Cys<sub>68</sub> weniger befähigt, die „lag“-Phase zu reduzieren.

Das gleiche gilt ebenfalls für die Aktivierung von SoxYZ durch unpersulfurierte SoxL Mutanten. Hier war es noch schwieriger eine Tendenz auszumachen, da sehr viele SoxL Mutanten die Aktivität steigerten. Eine Ausnahme bildete hierbei die SoxL<sub>179</sub> Mutante, welche keine Aktivitätssteigerung ermöglichte. Auch bei der Aktivitätssteigerung durch aktivierte SoxL Mutanten konnte kein eindeutiges Ergebnis erhalten werden. Mit SoxL sowie SoxL<sub>68</sub>, SoxL<sub>72</sub>, SoxL<sub>184</sub> wurden die höchsten Aktivitäten von ca. 30 m( $\Delta$ E/min) gemessen. Die geringste Aktivität fiel mit SoxL<sub>-Cys</sub> aus.

Die uneindeutigen Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass die Cysteine der SoxL Mutanten scheinbar auf eine artifizielle Art miteinander interagieren, was die 1,5-I-ADAENS Ergebnisse bereits gezeigt haben und somit ebenfalls unnatürliche Interaktionen mit SoxYZ eingehen könnten. Um diesen Umstand zu umgehen, wäre die Herstellung von SoxL Mutanten ratsam, deren N- bzw. C-Terminus vollständig deletiert wird. Hiermit könnte ebenfalls ein struktureller Einfluss, unabhängig von den Cysteinen, von SoxL auf SoxYZ untersucht werden, sofern das Protein dann stabil überproduziert und aufgereinigt werden kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass SoxL SoxYZ wahrscheinlich auf strukturelle Weise inaktiviert bzw. aktiviert, indem es eine Konformationsänderung innerhalb von SoxYZ bewirkt, wodurch die eigene Struktur ebenfalls verändert wird. Die detaillierten Vorgänge müssten allerdings noch mit weiteren Experimenten untersucht werden. Ferner scheint diese Interaktion nicht artifiziell



zu sein, da z.B. die periplasmatische Rhodanese Alvin\_0258 nicht in der Lage ist, diese Inaktivierung bzw. Aktivierung von SoxYZ zu verursachen.

Im Vorherigen konnte gezeigt werden, dass SoxL einen deutlichen Einfluss auf die Funktion von SoxYZ besitzt und somit ebenfalls die Aktivität des Sox Systems modifiziert (Welte et al., 2009). In dieser Arbeit konnte dieser Umstand bestätigt und weitere Erkenntnisse gewonnen werden. Während die unpersulfurierte Form von SoxL die mögliche T-Form von SoxYZ begünstigt, verhilft persulfuriertes SoxL die mögliche R-Form von SoxYZ auszubilden. Dabei könnte ein Schwefeltransfer von SoxYZ auf SoxL eine Rolle spielen. Dies würde allerdings bedeuten, dass SoxL wahrscheinlich nicht die Aufgabe besitzt, den gebundenen Sulfanschwefel weiter an die Schwefelkugeln zu transferieren. Hierfür konnte bisher auch keine experimentellen Beweise gefunden werden.



## Zusammenfassung

- Mittels Reporterprotein-Fusionierungen an Alvin\_3028 konnte nach heterologer Überexpression in *E. coli* die Verankerung des N-Terminus in der Membran sowie das Vorhandensein der C-terminalen, katalytischen Rhodanese-domäne im Cytoplasma bestimmt werden. Alvin\_3028 zeigte eine Thiosulfat:Cyanid-Schwefeltransferaseaktivität und auch Glutathionpersulfid und Polysulfide können als Substrate verwendet werden.
- Während der Thiosulfat- und Sulfidoxidation wird das Gen Alvin\_3028 konstitutiv exprimiert. Bei Vorhandensein von elementarem Schwefel wurden im späteren Oxidationsverlauf leicht erhöhte mRNA-Level erhalten, was für eine Bereitstellung des Proteins während des Abbaus von Schwefelkugeln spricht. Inserterung von Antibiotika-Kassetten sowie *in frame*-Deletionsverfahren lieferten keine Alvin\_3028-Mutanten, was eine Notwendigkeit des Proteins in *Alc. vinosum* andeutet.
- Das rekombinante Alvin\_0258 konnte vollständig charakterisiert werden. Bei der Katalyse des Thiosulfat:Cyanid-Schwefeltransfers, die über einen „Ping-Pong“-Mechanismus erfolgt, liegt das pH-Optimum zwischen 8,5 und 10 und das Temperaturoptimum bei 60 °C, wobei das Protein nur bei 30 °C stabil blieb. Weiterhin konnte eine hohe Polysulfid:Cyanid-Schwefeltransferase-Aktivität verzeichnet werden (die Affinität zu Glutathionpersulfid blieb hingegen gering).
- Die Schwefeltransferase Alvin\_0258 besitzt ca. 50 % der Gesamt-Rhodanese-Aktivität in *Alc. vinosum* und ist neben SoxL, die einzige annotierte Rhodanese im Periplasma. Trotzdem zeigten die hergestellten Mutanten *Alc. vinosum*  $\Delta tsdA\Delta soxL\Delta 0258$  und *Alc. vinosum*  $\Delta tsdA\Delta 0258$ , während des photolithoautotrophen Wachstums, keinerlei Unterschiede zum Wildtyp. Es zeigte sich jedoch, dass das Gen Alvin\_0258 zu Beginn der Oxidation von Sulfid, Thiosulfat und elementarem Schwefel in einem höheren Maße exprimiert wird, während beim Vorhandensein von Schwefelkugeln die mRNA-Level deutlich reduziert blieben.
- Die *in frame*-Deletionsmutante *Alc. vinosum*  $\Delta soxK$  war im Batch-Verfahren nicht in der Lage, Thiosulfat vollständig zu oxidieren, womit gezeigt wurde, dass SoxK den Enzymkomplex SoxXA stabil hält. Die phänotypischen Untersuchungen der Mutante, während des photolithoautotrophen Wachstums mit Sulfid, zeigten wiederum keine Beeinträchtigung von SoxXA. Dies bestätigt, dass das Sox-System nicht hauptsächlich für die Oxidation von Sulfid verantwortlich ist und unterstreicht, dass die Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase (SQR) als dominantes Schlüsselprotein für die Sulfid-Oxidation eine Rolle spielt.
- Nach der Aufreinigung des rekombinanten SoxYZ aus *Alc. vinosum* wurden eine heterodimere (SoxYZ) sowie eine heterotetramere Form (Sox(YZ)<sub>2</sub>) identifiziert, die über ein Disulfid

zwischen den beiden katalytischen Cysteinen (Cys<sub>152</sub>) zweier SoxY Einheiten gebildet wird, da eine heterotetramere Form nicht bei der Mutante SoxY<sub>C152S</sub>Z erhalten wurde. Weiterhin wird das rekombinante Sox(YZ)<sub>2</sub> Protein durch Sulfid persulfuriert und erfährt eine Konformationsänderung, wobei es zur heterodimeren Form gespalten und gleichzeitig das verborgene Cys<sub>152</sub> für z.B. 1,5-I-ADAENS zugänglich wird.

- Durch die Analysen des rekonstituierten Sox Systems, welche ausschließlich mit heterologen Sox-Proteinen aus *Alc. vinosum* erfolgten, konnte neben einer Aktivitätsphase ebenfalls eine anfängliche „lag“-Phase identifiziert werden, die vermutlich durch eine inaktivere Form von SoxYZ zustande kommt. Durch Inkubation mit Sulfid konnte die Aktivität gesteigert und die „lag“-Phase verringert werden. Dies allein reicht aber nicht aus, um diese vollständig zu umgehen.
- Mittels transkriptioneller Analysen konnte das Gen *soxL*, welches für eine annotierte Schwefeltransferase kodiert, als Teil dem *soxXAKL* Genclusters zugeordnet werden, da es zusammen mit *soxK* co-transkribiert wird.
- Die potentielle Schwefeltransferase SoxL zeigte zwar keine Thiosulfat:Cyanid Schwefeltransferaseaktivität, konnte aber nach Sulfidbehandlung zusätzlichen Schwefel aufnehmen, wobei das Cystein<sub>184</sub> dabei nicht beteiligt ist, da es nicht persulfuriert werden kann.
- In Anwesenheit von Sulfid war SoxL in der Lage Polysulfide zu bilden (wurden mittels UV/Vis-Absorptionsspektrometer detektiert), die bei aeroben Verhältnissen nach einiger Zeit zu Schwefel zerfielen.
- Durch Sulfid wird neben der Persulfurierung ebenfalls eine Konformationsänderung innerhalb von SoxL bewirkt, wie die Versuche mit 1,5-I-ADAENS verdeutlichen. In Anwesenheit von Sulfid nimmt SoxL eine Konformation an, bei welcher der Zugang zum Reagenz verhindert wird, da Schwefelbrücken oder Disulfidbindungen zwischen den Cysteinen Cys<sub>68</sub> und Cys<sub>72</sub> bzw. Cys<sub>179</sub> und Cys<sub>184</sub> gebildet werden (auch unter anaeroben Bedingungen). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich Cys<sub>179</sub> in einer sterisch unzugänglichen Position befindet. Ferner scheinen die Cysteine sehr reaktiv zu sein, da sie Schwefelbrücken- oder Disulfidbindungen ausbilden, wenn ihr natürlicher Reaktionspartner nicht vorhanden ist. Somit können z.B. auch artifizielle Bindungen zwischen Cys<sub>72</sub> und Cys<sub>184</sub> ausgebildet werden.
- Mittels Präzipitationsstudien und nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen konnte eine Interaktion zwischen SoxYZ und SoxL nachgewiesen werden. Ferner nimmt SoxL Sulfanschwefel von SoxYZ auf.
- Unpersulfuriertes SoxL verlängert die „lag“-Phase des Sox Systems, wohingegen die Aktivitätsphase gesteigert wird. Im Gegensatz dazu, verkürzt persulfuriertes SoxL die „lag“-Phase und eine weitere Steigerung der Aktivitätsphase wurde erhalten. Die Interaktion zwischen SoxL und SoxYZ beruht vermutlich auf eine strukturelle Inaktivierung bzw. Aktivierung von SoxYZ durch SoxL.

## Literaturverzeichnis

- Acosta, M., Beard, S., Ponce, J., Vera, M., Mobarec, J. C. and Jerez, C. A. (2005). Identification of putative sulfurtransferase genes in the extremophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 genome: structural and function characterization of the proteins. *OMICS* **9**, 13–29.
- Agboola, F. K. and Okonji, R. E. (2004). Presence of rhodanese in the cytosolic fraction of the fruit bat (*Eidolon helvum*) liver. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **37(3)**, 275–281.
- Aich, S., Delbaere, L. T. J. and Chen, R. (2001). Continuous spectrophotometric assay for  $\beta$ -Glucuronidase. *Bio. Techniques* **30**, 846–850.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
- Appia-Ayme, C., Little, P. J., Matsumoto, Y., Leech, A. P. and Berks, B. C. (2001). Cytochrome complex essential for phototrophic oxidation of both thiosulfate and sulfide in *Rhodovulum sulfidophilum*. *J. Bacteriol.* **183**, 6107–6118.
- Aussignargues, C., Giuliani, M. C., Infossi, P., Lojou, E., Guiral, M., Giudici-Orticoni, M. T. and Ilbert, M. (2012). Rhodanese functions as a sulfur supplier for key enzymes in sulfur energy metabolism. *J. Biol. Chem* **287**, 19936–19948.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1997). Current protocols in molecular biology. *John Wiley & Sons John Wiley & Sons*, New York.
- Bamford, V. A., Bruno, S., Rasmussen, T., Appia-Ayme, C., Cheesman, M. R., Berks, B. C. and Hemmings, A. M. (2002). Structural basis for the oxidation of thiosulfate by a sulfur cycle enzyme. *EMBO J.* **21**, 5599–5610.
- Bartlett, P. D. and Skoog, D. A. (1954). Colorimetric determination of elemental sulfur in hydrocarbons. *Anal. Chem.* **26**, 1008–1011.
- Bazal, M. and Helsinki, D. R. (1968). Circular DNA forms of colicinogenic factors E1, E2 and E3 from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **36**, 185–194.
- Bessey, O. A., Lowry, O. H. and Brock, J. J. (1946). A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* **164**, 321–329.

- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93–99.
- Bordo, D. and Bork, P.** (2002). The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Reports* **3**, 741–746.
- Borkenstein, C. G. and Fischer, U. F.** (2006). Sulfide removal and elemental sulfur recycling from a sulfide-polluted medium by *Allochromatium vinosum* strain 21D. *Int. Microbiol.* **9**, 253–258.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248.
- Brito, J. A., Denkmann, K., Pereira, I. A. C., Archer, M. and Dahl, C.** (2015). Thiosulfate dehydrogenase (TsdA) from *Allochromatium vinosum*: Structural and functional insights into thiosulfate oxidation. *J. Biol. Chem.* **290**, 9222–9238.
- Brüser, T., Lens, P. and Trüper, H. G.** (2000). The biological sulfur cycle. *Environmental Technologies to treat Sulfur Pollution*. **Lens, P. and Pol, L.H.** (eds.) IWA Publishing, London, 47–86.
- Brune, D.** (1989). Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **975**, 189–221.
- Brune, D. C.** (1995). Isolation and characterization of sulfur globule proteins from *Chromatium vinosum* and *Thiocapsa roseopersicina*. *Arch. Microbiol.* **163**, 391–399.
- Busenlehner, L. S., Pennella, M. A. and Giedroc, D. P.** (2003). The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **27(2-3)**, 131–143.
- Bushweller, J. H., Billeter, M., Holmgren, A. and Wüthrich, K.** (1994). The NMR solution structure of the mixed disulfide between *E. coli* glutaredoxin (14s) and glutathione. *J. Mol. Biol.* **235**, 1585–1597.
- Calabrese, L., Federici, G., Bannister, W. H., Bannister, J. V., Rotilio, G. and Finazzi-Agro, A.** (1975). Labile sulfur in human Superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **56**, 305–309.
- Cheng, H., Donahue, J. L., Battle, S. E., Ray, W. K. and Larson, T. J.** (2008). Biochemical and genetic characterization of PspE and GlpE, two single-domain sulfurtransferases of *Escherichia coli*. *Open Microbiol. J.* **2**, 18–28.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G. and Thompson, J. D.** (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3497–3500.
- Chrysostomou, C., Quandt, E. M., Marshall, N. M., Stone, E. and Georgiou, G.** (2015). An alternate pathway of arsenate resistance in *E. coli* mediated by the glutathione S-transferase GstB. *ACS Chemical Biology* **10**, 875–882.

- Cianci, M., Gliubich, F., Zanotti, G. and Berni, R. (2000). Specific interaction of lipoate at the active site of rhodanese. *Biochim. Biophys. Acta* **1481**, 103–108.
- Cipollone, R., Bigotti, M. G., Frangipani, E., Ascenzi, P. and Visca, P. (2004). Characterization of a rhodanese from the cyanogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **325**, 85–90.
- Cord-Ruwisch, R. (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods* **4**, 33–36.
- Cort, J. R., Selan, U. M., Schulte, A., Grimm, F., Kennedy, M. A. and Dahl, C. (2008). *Allochromatium vinosum* DsrC: solution state NMR structure, redox properties and interaction with DsrEFH, a protein essential for purple sulfur bacteria oxidation. *J. Mol. Biol.* **382**, 692–707.
- Dagert, M. and Ehrlich, S. D. (1974). Prolonged incubation in calcium chloride improves competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**, 23–28.
- Dahl, C. (1996). Insertional gene inactivation in a phototrophic sulphur bacterium: APS-reductase-deficient mutant of *Chromatium vinosum*. *Microbiology* **142**, 3363–3372.
- Dahl, C., Engels, S., Pott-Sperling, A. S., Schulte, A., Sander, J., Lübbe, Y., Deuster, O. and Brune, D. C. (2005). Novel genes of the *dsr* gene cluster and evidence for close interaction of Dsr proteins during sulfur oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *J. Bacteriol.* **187**, 1392–1404.
- Dahl, C., Franz, B., Hensen, D., Kesselheim, A. and Zigann, R. (2013a). Sulfite oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: Identification of SoeABC as a major player and relevance of SoxYZ in the process. *Microbiology* **159**, 2626–2638.
- Dahl, C., Prange, A. and Steudel, R. (2002). Natural polymeric sulfur compounds. *Miscellaneous Biopolymers and Biodegradation of Synthetic Polymers*. Steinbüchel, A. (ed.) Wiley-VCH, Weinheim, 35–62.
- Dahl, C., Schulte, A., Stockdreher, Y., Hong, C., Grimm, F., Sander, J., Kim, R., Kim, S. H. and Shin, D. H. (2008). Structural and molecular genetic insight into a widespread bacteria sulfur oxidation pathway. *J. Mol. Biol.* **384**, 1287–1300.
- Dahl, C. and Trüper, H. G. (1994). Enzymes of dissimilatory sulfide oxidation in phototrophic bacteria. *Meth. Enzymol.* **243**, 400–421.
- Dahl, J. U., Radon, C., Bühning, M., Nimtz, M., Leichert, L. I., Denis, Y., Jourlin-Castelli, C., Iobbi-Nivol, C., Méjean, V. and Leimkühler, S. (2013b). The sulfur carrier protein TusA has a pleiotropic role in *Escherichia coli* that also affects molybdenum cofactor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **288**, 5426–5442.
- Demmer, J., Huang, H., Wang, S., Demmer, U., Thauer, R. and Ermler, U. (2015). Insights into flavinbased electron bifurcation via the NADH-dependent reduced ferredoxin:NADP oxidoreductase structure. *J. Biol. Chem.* **290**, 21985–21995.

- Denkmann, K., Grein, F., Zigann, R., Siemen, A., Bergmann, J., Van Helmont, S., Nicolai, A., Pereira, I. A. C. and Dahl, C. (2012). Thiosulfate dehydrogenase: A widespread unusual acidophilic c-type cytochrome. *Environ. Microbiol.* **14**(10), 2673–2688.
- Dincturk, H. B., Demir, V. and Aykanat, T. (2011). B<sub>6</sub> oxidase homolog of photosynthetic purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* is co-transcribed with a nitrogen fixation related gene. *Antonie van Leeuwenhoek* **99**, 211–220.
- Dóka, E., Pader, I., Biró, A., Johansson, K., Cheng, Q., Ballagó, K., Prigge, J., Pastor-Flores, D., Dick, T. P., Schmidt, E. E., Arnér, E. S. J. and Nagy, P. (2016). A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thio-redoxin and glutathione systems. *Sci. Adv.* **2**, 1–14.
- Domin, C. (2013). *In-vitro* Untersuchungen von SoxL, einer potentiellen Schwefeltransferase, aus *Allochromatium vinosum*. Bachelorarbeit University, Bonn.
- Ehigie, L. O., Okonji, R. E., Ehigie, A. F., Olapej, A. O. and Fagbohunka, B. S. (2015). Purification and characterization of rhodanese from the leave of bitter melon *Momordica charantia*. *International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences* **3**(5), 2347–4580.
- Ehrmann, M., Boydt, D. and Beckwith, J. (1990). Genetic analysis of membrane protein topology by a sandwich gene fusion approach. *PNAS* **87**, 7574–7578.
- Epel, B., Schäfer, K., Quentmeier, A., Friedrich, C. and Lubitz, W. (2005). Multifrequency EPR analysis of the dimanganese cluster of the putative sulfate thiohydrolase SoxB of *Paracoccus pantotrophus*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **10**, 636–642.
- Fellay, R., Frey, J. and Krisch, H. M. (1987). Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: A family of DNA fragments designed for *in vivo* insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. *Gene* **52**, 147–154.
- Florentino, A. P., Pereira, I. A. C., Boeren, S., van den Born, M., Stams, A. J. M. and Sánchez-Andrea, I. (2019). Insight into the sulfur metabolism of *Desulfurella amülsii* by differential proteomics. *Environ. Microbiol.* **21**, 209–225.
- Franz, B., Gehrke, T., Lichtenberg, H., Hormes, J., Dahl, C. and Prange, A. (2009). Unexpected extracellular and intracellular sulfur species during the growth of *Allochromatium vinosum* with reduced sulfur compounds. *Microbiology* **155**, 2766–2774.
- Friedrich, C. G., Bardischewsky, F., Rother, D., Quentmeier, A. and Fischer, J. (2005). Prokaryotic sulfur oxidation. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 253–259.
- Friedrich, C. G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A. and Fischer, J. (2001). Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: Emergence of a common mechanism? *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2873–2882.
- Frigaard, N. U. and Dahl, C. (2009). Sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **54**, 103–200.



- Grabarczyk, D. and Berks, B. (2017). Intermediates in the Sox sulfur oxidation pathway are bound to a sulfane conjugate of the carrier protein SoxYZ. *PLoS One* **12**, e0173395.
- Grabarczyk, D., Chappell, P., Johnson, S., Stelzl, L., Lea, S. and Berks, B. (2015). Structural basis for spespecific and promiscuity in a carrier protein/enzyme system from the sulfur cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 166–175.
- Grant, W. M. (1947). Colorimetric determination of sulfur dioxide. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **19**, 345–346.
- Gregersen, L. H., Bryant, D. A. and Frigaard, N. U. (2011). Mechanisms and evolution of oxidative sulfur metabolism in green sulfur bacteria. *Front. Microbiol.* **2**, 116.
- Greiner, R., Pálinkás, Z., Bäsell, K., Becher, D., Antelmann, H., Nagy, P. and Dick, T. P. (2013). Polysulfides link H<sub>2</sub>S to protein thiol oxidation. *Antioxid Redox Signal* **19**(15), 1749–1765.
- Griesbeck, C., Schütz, M., Schödl, T., Bathe, S., Nausch, L., Mederer, N., Vielreicher, M. and Hauska, G. (2002). Mechanism of sulfide-quinone oxidoreductase investigated using site-directed mutagenesis and sulfur analysis. *Biochemistry* **41**, 11552–11565.
- Grimm, F., Cort, J. R. and Dahl, C. (2010). DsrR, a novel IscA-like protein lacking iron-binding function involved in the regulation of sulfur oxidation in *Allochromatium vinosum*. *J. Bacteriol.* **192**, 1652–1661.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. and Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**(4), 692–744.
- Hensen, D., Sperling, D., Trüper, H. G., Brune, D. C. and Dahl, C. (2006). Thiosulphate oxidation in the phototrophic sulphur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Mol. Microbiol.* **62**, 794–810.
- Hipp, W. M., Pott, A. S., Thum-Schmitz, N., Faath, I., Dahl, C. and Trüper, H. G. (1997). Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes. *Microbiology* **143**, 2891–2902.
- Hofmann, K., Bucher, P. and Kajava, A. V. (1998). A model of Cdc25 phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the presence of a rhodanese hhomolog domain. *J. Mol. Biol.* **282**, 195–208.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* **264**, 13963–13966.
- Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lönn, M. E., Hudemann, C. and H., L. C. (2005). Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1375–1377.

- Horowitz, P. and Criscimagna, N. L.** (1983). The use of intrinsic protein fluorescence to quantitate enzyme-bound persulfide and to measure equilibria between intermediates in rhodanese catalysis. *J. Biol. Chem.* **258**, 7894–7896.
- Horton, R. M.** (1995). PCR mediated recombination and mutagenesis: SOEing together tailor-made genes. *Mol. Biotechnology* **3**, 93–99.
- Hysin, J. W. and Wood, J. L.** (1959). Enzymatic formation of polysulfides from mercaptopyruvate. *J. Biol. Chem.* **234**, 2141–2144.
- Imhoff, J. F., Siling, J. and 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. Sys. Bacteriol.* **48**, 1129–1143.
- Jarabak, R. and Westley, J.** (1974). Human liver rhodanese: Nonlinear kinetic behaviour in double displacement. *Biochemistry* **13**(16), 3233–3236.
- Kallnik, V., Meyer, M., Deppenmeier, U. and Schweiger, P.** (2010). Construction of expression vectors for protein production in *Gluconobacter oxydans*. *J. Biotechnol.* **150**(4), 460–465.
- Kamyshny, A., Goifman, A., Gun, J., Rizkov, D. and Lev, O.** (2004). Equilibrium distribution of polysulfide ions in aqueous solutions at 25 degrees C: a new approach for the study of polysulfides equilibria. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 6633–6644.
- Karlson, P., Doenecke, D. and Koolman, J.** (1994). *Kurzes Lehrbuch der Biochemie fur Mediziner und Naturwissenschaftler*. Georg Thieme Verlag.
- Kelly, D. P., Chambers, L. A. and Trudinger, P. A.** (1969). cyanolysis and spectrophotometric estimation of trithionate in mixture with thiosulfate and tetrathionate. *Anal Chem* **41**, 898–901.
- Kessler, D.** (2006). Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Re.* **30**, 825–840.
- Klimmek, O., Kreis, V., Klein, C., Simon, J., Wittershagen, A. and Kroeger, A.** (1998). The function of the periplasmic Sud protein in polysulfide respiration of *Wolinella succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* **253**, 263–269.
- Klimmek, O., Kroger, A., Steudel, R. and Holdt, G.** (1991). Growth of *Wolinella succinogenes* with polysulphide as terminal acceptor of phosphorylative electron transport. *Arch. Microbiol.* **155**, 177–182.
- Klimmek, O., Stein, T., Pisa, R., Simon, J. and Kroger, A.** (1999). The single cysteine residue of the Sud protein is required for its function as a polysulfide-sulfur transferase in *Wolinella succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* **263**, 79–84.
- Kampf, C. and Pfennig, N.** (1980). Capacity of *Chromatiaceae* for chemotrophic growth. Specific respiration rates of *Thiocystis violacea* and *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **127**, 125–135.

- Koshland, D. E. J., Némethy, G. and Filmer, D. (1966). Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* **5**(1), 365–385.
- Kreis-Kleinschmidt, V., Fahrenholz, F., Kojro, E. and Kroger, A. (1995). Periplasmic sulphide dehydrogenase (Sud) from *Wolinella succinogenes*: isolation, nucleotide sequence of the *sud* gene and its expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **227**, 137–142.
- Krishnan, N., Fu, C., Pappin, D. J. and K., T. N. (2011). H<sub>2</sub>S-induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. *Sci. Signal* **4**, 86.
- Krätzer, C. (2007). Plasposon-Mutagenese und Überproduktion von Sox proteinen aus *Allochro-matium vinosum*. *Diplomarbeit University*, Bonn.
- Kurth, J. M., Brito, J. A., Reuter, J., Flegler, A., Koch, T., Franke, T., Klein, E.-M., Rowe, S. F., Butt, J. N., Denkmann, K., Pereira, I. A. C., Archer, M. and Dahl, C. (2016). Electron accepting units of the diheme cytochrome *c* TsdA, a bifunctional thiosulfate dehydrogenase-tetrathionate reductase. *J. Biol. Chem.* **291**, 24804–24818.
- Kurth, J. M. and Dahl, C. (2017). Ein altes paar in neuem glanz: Thiosulfat und Tetrathionat. *BIOspektrum* **23**, 25–27.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lang, K. (1933). Die Rhodanbildung in Tierkörper. *Biochemische Zeitschrift* **259**, 243–256.
- Laudenbach, D. E., Ehrhardt, D., Green, L. and Grossman, A. (1991). Isolation and characterization of a sulfur-regulated gene encoding a periplasmically localized protein with sequence similarity to rhodanese. *J. Bacteriol.* **173**, 2751–2760.
- Laxa, M., König, J., Dietz, K. J. and Kandlbinder, A. (2007). Role of the cysteine residues in *Arabidopsis thaliana* cyclophilin CYP20-3 in peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and redox-related functions. *Biochem. J.* **401**(1), 287–297.
- Lübbe, Y. J., Youn, H. S., Timkovich, R. and Dahl, C. (2006). Siro(haem)amide in *Allochro-matium vinosum* and relevance of DsrL and DsrN, a homolog of cobyrinic acid *a, c* diamide synthase for sulphur oxidation. *FEMS Microbiol. Lett.* **261**, 194–202.
- Lee, C. H., Hwang, J. H., Lee, Y. S. and Cho, K. S. (1995). Purification and characterization of mouse liver rhodanese. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 170–176.
- Lemaire, S. D. (2004). The glutaredoxin family in oxygenic photosynthetic organisms. *Photosynth. Res.* **79**(3), 305–318.
- Löffler, M., Feldhues, J., Venceslau, S. S., Kammler, L., Grein, F., Pereira, I. A. C. and Dahl, C. (2020). DsrL mediates electron transfer between NADH and rDsrAB in *Allochro-matium vinosum*. *Environ. Microbiol.* **22**, 783–795.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2ddC(T) method. *Methods* **25**, 402–408.

- Miroux, B. and Walker, J. E.** (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**(3), 289–98.
- Mizuno, T., Chou, M. Y. and Inouye, M.** (1984). A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1966–1970.
- Molitor, C.** (2013). *In vivo* Untersuchung einer SoxXAK-Mutante und Analyse des SoxXAK-Komplexes *in vitro*. *Bachelorarbeit University, Bonn*.
- Mueller, E. G.** (2006). Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways. *Nature Chem. Biol.* **2**, 185–194.
- Mullis, K. B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. K., Horn, G. T. and Erlich, H. A.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263–335.
- Nandi, D. L., Horowitz, P. M. and Westley, J.** (2000). Rhodanese as a thioredoxin oxidase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 973–977.
- Ogawa, T., Furusawa, T., Nomura, R., Seo, D., Hosoya-Matsuda, N., Sakurai, H. and Inoue, K.** (2008). SoxAX binding protein, a novel component of the thiosulfate-oxidizing multi-enzyme system in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *J. Bacteriol.* **190**, 6097–6110.
- Pachmayr, F.** (1960). Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen in Mineralwasser. *PhD thesis University, München*.
- Pagani, S., Forlani, F., Carpen, A., Bordo, D. and Colnaghi, R.** (2000). Mutagenic analysis of Thr-232 in rhodanese from *Azotobacter vinelandii* highlighted the differences of this prokaryotic enzyme from the known sulfurtransferases. *FEBS Lett.* **472**, 307–311.
- Pankraz, O.** (2009). Zielgerichtete Mutagenese und biochemische Charakterisierung von purpurbakteriellen Sox-Proteinen aus *Allochromatium vinosum*. *Diplomarbeit Universität Bonn*.
- Pattaragulwanit, K. and Dahl, C.** (1995). Development of a genetic system for a purple sulfur bacterium: Conjugative plasmid transfer in *Chromatium vinosum*. *Arch.* **164**, 217–222.
- Pfennig, N. and Trüper, H.** (1989). Anoxygenic phototrophic bacteria. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology* **3**, 1635–1653.
- Pfennig, N. and Trüper, H. G.** (1992). The family *Chromatiaceae*. In *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, Springer, New York, 3200–3221.
- Ploegman, J. H., Drent, G., Kalk, K. H., Hol, W. G. J., Heinrikson, R. L., Keim, P., Weng, L. and Russel, J.** (1978). The covalent and tertiary structure of bovine liver rhodanese. *Nature* **273**, 124–129.

- Pott, A. S. and Dahl, C.** (1998). Sirohaem-sulfite reductase and other proteins encoded in the *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiology* **144**, 1881–1894.
- Prange, A., Arzberger, I., Engemann, C., Modrow, H., Schumann, O., Trüper, H. G., Steudel, R., Dahl, C. and Hormes, J.** (1999). *In situ* analysis of sulfur in the sulfur globules of phototrophic sulfur bacteria by X-ray absorption near edge spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1428**, 446–454.
- Prange, A., Chauvistre, R., Modrow, H., Hormes, J., Trüper, H. G. and Dahl, C.** (2002). Quantitative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different speciation of sulfur. *Microbiology* **148**, 267–276.
- Prange, A., Engelhard, H., Trüper, H. G. and Dahl, C.** (2004). The role of the sulfur globule proteins of *Allochromatium vinosum*: mutagenesis of the sulfur globule protein genes and expression studies by real-time RT PCR. *Arch. Microbiol.* **182**, 165–174.
- Quentmeier, A. and Friedrich, C. G.** (2001). The cysteine residue of the SoxY protein as the active site of protein-bound sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17. *FEBS Lett.* **503**, 168–172.
- Quentmeier, A., Janning, P., Hellwig, P. and Friedrich, C. G.** (2007). Activation of the heterodimeric central complex SoxYZ of chemotrophic sulfur oxidation is linked to a conformational change and SoxY-Y interprotein disulfide formation. *Biochemistry* **46**, 10990–10998.
- Quentmeier, A., Lib, L. and Friedrich, C. G.** (2008). Identification of two inactive forms of the central sulfur cycle protein SoxYZ of *Paracoccus pantotrophus*. *FEBS Lett.* **582**, 3701–3704.
- Ray, W. K., Zeng, G., Potters, M. B., Mansuri, A. M. and Larson, T. J.** (2000). Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J. Bacteriol.* **182**, 2277–2284.
- Reinartz, M., Tschäpe, J., Brüser, T., Trüper, H. G. and Dahl, C.** (1998). Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **170**, 59–68.
- Rohwerder, T. and Sand, W.** (2003). The sulfane sulfur of persulfide is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology* **149**, 1699–1710.
- Rother, D., Orawski, G., Bardischewsky, F. and Friedrich, C.** (2005). SoxRS-mediated regulation of chemotrophic sulfur oxidation in *Paracoccus pantotrophus*. *Microbiology* **151**, 1707–1716.
- Saidu, Y.** (2004). Physicochemical features of rhodanese: A review. *African Journal of Biotechnology* **3**(4), 370–374.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory* .

- Sander, J., Engels-Schwarzlose, S. and 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**, 357–366.
- Santos, A. A., Venceslau, S. S., Grein, F., Leavitt, W. D., Dahl, C., Johnston, D. T. and Pereira, I. A. C. (2015). A protein trisulfide couples dissimilatory sulfate reduction to energy conservation. *Science* **350**, 1541–1545.
- Sauvé, V., Bruno, S., Berks, B. C. and Hemmings, A. M. (2007). The SoxYZ complex carries sulfur cycle intermediates on a peptide swinging arm. *J. Biol. Chem.* **282**, 23194–23204.
- Schedel, M., Vanselow, M. and Trüper, H. G. (1979). Siroheme sulfite reductase isolated from *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **121**, 29–36.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. and Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69–73.
- Schmidt, G. L., Nicholson, G. L. and Kamen, M. D. (1971). Composition of the sulfur particle of *Chromatium vinosum*. *J. Bacteriol.* **105**, 1137–1141.
- Simon, R., Prierer, U. and Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**, 784–791.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific ssequence among dna fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**.
- Southern, E. M. (1979). Gel electrophoresis of restriction fragments. *Meth. Enzymol.* **68**.
- Spallarossa, A., Donahue, J., Larson, T. J., Bolognesi, M. and Bordo, D. (2001). *Escherichia coli* GlpE is a prototype sulfurtransferase for the single-domain rhodanese homology superfamily. *Structure* **9**, 1117–1125.
- Sörbo, B. H. (1953). Rhodanese. *Acta Chem. Scand.* **7**, 1137–1145.
- Sörbo, B. H. (1953a). Crystalline rhodanese. Purification and physiochemical examination. *Acta Chemica Scandinavica* **7**, 1129–1136.
- Sörbo, B. H. (1987). Sulfate: turbidometric and nephelometric methods. *Meth. Enzymol.* **143**, 3–6.
- Studel, R., Holdt, G., Visscher, P. T. and van Gernerden, H. (1990). Search for polythionates in cultures of *Chromatium vinosum* after sulfide incubation. *Arch. Microbiol.* **155**, 432–437.
- Stockdreher, Y., Sturm, M., Josten, M., Sahl, H. G., Dobler, N., Zigann, R. and Dahl, C. (2014). New proteins involved in sulfur trafficking in the cytoplasm of *Allochromatium vinosum*. *J. Biol. Chem.* **289**, 12390–12403.

- Stout, J., van Driessche, G., Savvides, S. N. and van Beeumen, J.** (2007). X-ray crystallographic analysis of the sulfur carrier protein SoxY from *Chlorobium limicola*, *thiosulfatophilum* reveals a tetrameric structure. *Protein Sci.* **16**, 589–601.
- Tanabe, T. S., Leimkühler, S. and Dahl, C.** (2019). The functional diversity of the prokaryotic sulfur carrier protein TusA. *Adv. Microb. Physiol.* **75**, 233–277.
- Thiele, H. H.** (1968). Die Verwertung einfacher organischer Substanzen durch *Thiorhodaceae*. *Arch. Mikrobiol.* **60**, 124–138.
- Thomé, R., Gust, A., Toci, R., Mendel, R. R., Bittner, F., Magalon, A. and Walburger, A.** (2012). A sulfurtransferase is essential for activity of formate dehydrogenase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **287**, 4671–4678.
- Urban, P. J.** (1961). Calorimetry of sulphur anions. An improved calorimetric method for the determination of thiosulphate. *Fresenius Ana. Chem.* **179**, 415–422.
- Vasas, A., Dóka, E., Fábián, I. and Nagy, P.** (2015). Kinetic and thermodynamic studies on the disulfide-bond reducing potential of hydrogen sulfide. *P. Nitric Oxide* **46**, 93–101.
- Vazquez, E., Buzaleh, A. M., Wider, E. and Batlle, A. M.** (1987). Red blood cell rhodanese: Its possible role in modulating delta-amino levulinate synthetase activity in mammals. *Int. J. Biochem.* **19**(2), 217–219.
- Venceslau, S. S., Stockdreher, Y., Dahl, C. and Pereira, I. A. C.** (2014). The "bacterial heterodisulfide" DsrC is a key protein in dissimilatory sulfur metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 1148–1164.
- Weaver, P. F., Wall, J. D. and Gest, H.** (1975). Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* **105**, 207–216.
- Weissgerber, T., Dobler, N., Polen, T., Latus, J., Stockdreher, Y. and Dahl, C.** (2013). Genome-wide transcriptional profiling of the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* DSM 180 (T) during growth on different reduced sulfur compounds. *J. Bacteriol.* **195**(18), 4231–4245.
- Weissgerber, T., Sylvester, M. and Kröniger, L.** (2014a). A comparative quantitative proteome study identifies new proteins relevant for sulfur oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2279–2292.
- Weissgerber, T., Watanabe, M., Hoefgen, R. and Dahl, C.** (2014b). Metabolomic profiling of the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* during growth on different reduced sulfur compounds and malate. *Metabolomics* **10**, 1094–1112.
- Weissgerber, T., Zigann, R., Bruce, D., Chang, Y. J., Detter, J. C., Han, C., Hauser, L., Jeffries, C. D., Land, M., Munk, A. C., Tapia, R. and Dahl, C.** (2011). Complete genome sequence of *Allochromatium vinosum* DSM 180 (T). *Stand. Genomic Sci.* **5**, 311–330.

- Welte, C., Hafner, S., Krätzer, C., Quentmeier, A. T., Friedrich, C. G. and Dahl, C. (2009). Interaction between Sox proteins of two physiologically distinct bacteria and a new protein involved in thiosulfate oxidation. *FEBS Lett.* **583**, 1281–128610.
- Westley, J., Adler, H., Westley, L. and Nishida, C. (1983). The sulfurtransferase. *Fundam. Appl. Toxicol.* **3**, 377–382.
- Wilson, L. G., Asahi, T. and Bandurski, R. S. (1961). Yeast sulfate-reducing system. Reduction of sulfate to sulfite. *J. Biol. Chem.* **236**, 1822–1829.
- You, Z., Cao, X., Taylor, A. B., Hart, P. J. and Levine, R. L. (2010). Characterization of a covalent polysulfane bridge in Cu, Zn superoxide dismutase. *Biochemistry* **49**(6), 1191.
- Zander, U., Faust, A., Klink, B. U., de Sanctis, D., Panjikar, S., Quentmeier, A., Bardischewsky, F., Friedrich, C. G. and Scheidig, A. J. (2010). Structural basis for the oxidation of protein-bound sulfur by the sulfur cycle molybdohemo-enzyme sulfane dehydrogenase SoxCD. *J. Biol. Chem.* **286**, 8349–8360.
- Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L. and Dean, D. R. (1994). Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the *nifS* gene product. *Biochemistry* **33**, 4714–4720.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bedanken:

- bei Priv.-Doz. Dr. Christiane Dahl, für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes am IfMB, die vielen anregenden Diskussionen und das geduldige Durchgehen meiner Ergebnisse, die nicht immer einfach zu deuten waren. Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich dafür bedanken, dass sie mir Zeit eingeräumt und mich ermutigt hat, mein neues Berufsfeld als Lehrerin zu ergreifen.
- bei Prof. Dr. Uwe Deppenmeier für die freundliche Übernahme des Koreferates.
- bei Dr. Oliver Klimmek, der mich nach Darmstadt in die Technische Universität eingeladen hat, um die Polysulfid-Assays durchzuführen und die wertvollen Diskussion bei allen VAAM Tagungen.
- bei Michael Josten, für die MADLI-TOF Spektren und Prof. Hans-Georg Sahl, der mir die Möglichkeit gegeben hat, mit Michael Josten zu arbeiten.
- bei Verena Kallnik und Prof. Dr. Uwe Deppenmeier, für die Bereitstellung von Plasmiden für den Glucuronidase-Aktivitätsnachweis.
- bei Katja Kirsch, für die vorangegangenen Ergebnisse und die Bereitstellung der *Alc. vinosum*  $\Delta$ *soxK* Mutante.
- bei Renate Zigann, für die Bereitstellung der *Alc. vinosum*  $\Delta$ *tsdA* Mutante. Vor allem aber, dass sie mir bei allen Fragen zu technischen, experimentellen und lebensnahen Themen aushief und auch immer eingesprungen ist, wenn etwas mal nicht so klappen wollte.
- bei Yvonne Stockdreher und Lijun Liu, die ebenfalls als Doktoranden an Schwefeltransferasen arbeiteten und mit denen immer intensive Diskussion geführt wurden. Wir werden wirklich niemals das Reagenz 1,5-I-ADAENS vergessen, das uns für einen Großteil unserer Arbeiten beschäftigt hielt. Darüber hinaus, möchte ich mich für die sehr fröhliche Zusammenarbeit bedanken, die natürlich auch von vielen anderen Gesprächsthemen geprägt war.
- bei Thomas Weissgerber, der die RNA aus *Alc. vinosum*, die auf elementarem Schwefel wuchs, lieferte und für seine ausgiebigen Transkriptom-, Proteom- und Metabolomstudien. Ich werde niemals seine direkte Art vergessen, mit welcher er die Tatsachen ganz klar auf den Tisch legte und seine Arbeitswut, mit welcher er uns alle antrieb.
- bei Claudia Domin und Christina Molitor, die mir im Zuge ihrer Masterarbeiten, viele Ergebnisse lieferten, die auch in dieser Arbeit Verwendung fanden.

- bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Schwefelarbeitsgruppe für die hervorragende Atmosphäre, vielseitigen Anregungen und schönen Abenden, die wir im Garten des Institutes verbracht haben. Yvonne Stockdreher, Thomas Weissgerber, Kevin Denkmann, Lijun Liu, Anne Nicolai, Anne Kesselheim, Simone Waclawek und Renate Zigann - wir waren „The Fun Group“.
- bei allen Mitarbeitern des IfMB der Universität Bonn für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft.
- bei Fabian Grein, Cornelia Welte, Christian Krätzer, Verena Kallnik, Paul Schweiger, die mir gruppenübergreifend mit Rat und Tat beiseite standen.
- bei meinen aktuellen KuK aus dem Franziskus Gymnasium Nonnenwerth, vor allem der Biologie-Arbeitsgruppe, die mich trotz stressiger Schulzeiten immer ermutigt haben, diese Arbeit fertig zu stellen.
- bei meiner Familie, Freunden („Ja, ich schreibe in den Ferien weiter.“) und meinem Lebensgefährten Norman Teichmann, die mich motiviert und oftmals den Rücken frei hielten.

---

## Publikationen

### Artikel

Draaken, M., Prins, W., Zeidler, C., Hilger, A., Mughaal, S.S., **Latus, J.**, Boemers, T.M., Schmidt, D., Schmiedeke, E., Spsychalski, N., Bartels, E., Nöthen, M.M., Reutter, H. and Ludwig, M. (2012). Involvement of the WNT and FGF signaling pathways in non-isolated anorectal malformations: sequencing analysis of WNT3A, WNT5A, WNT11, DACT1, FGF10, FGFR2 and the T gene. *Int. J. Mol. Med.* **6**: 1459-64. doi: 10.3892/ijmm.2012.1124

Weissgerber, T., Dobler, N., Polen, T., **Latus, J.**, Stockdreher, Y. and Dahl, C. (2013). Genome-wide transcriptional profiling of the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* DSM 180<sup>T</sup> during growth on different reduced sulfur compounds. *J. Bacteriol.* **195**: 4231-45. doi: 10.1128/JB.00154-13

### Konferenzbeiträge

**Latus, J.**, Molitor, C., Domin, C., Kirsch, K., Josten, M., Sahl, H. G. and Dahl, C. (2014). New functional insights into the Sox proteins from *Allochromatium vinosum*. *Conference of the DGHM and VAAM*. Dresden, Germany.

**Latus, J.**, Pankraz, O. and Dahl, C. (2013). The function of SoxL in the purple sulfur bacterial thiosulfate-oxidizing Sox system. *Conference of the DGHM and VAAM*. Bremen, Germany.

Stockdreher, Y., **Latus, J.**, Josten, M, Sahl, H.G. and Dahl, C. (2012). Sulfurtransferases - Essential players for dissimilatory sulfur oxidation in *Allochromatium vinosum*? *Workshop on Microbial Sulfur Metabolism*. Noordwijkerhout, The Netherlands.