

Sulfid-Chinon Reduktase (SQR) aus *Aquifex aeolicus*:  
Gensynthese, Expression, Reinigung und  
biochemische Charakterisierung

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Thomas Schödl**  
aus Eichstätt  
Regensburg, 2003

Promotionsgesuch eingereicht am: 9. Juli 2003

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Günter Hauska

Prüfungsausschuß:

Prof. Dr. Armin Kurtz (Vorsitzender)

Prof. Dr. Günter Hauska (1. Gutachter)

Prof. Dr. Peter Hegemann (2. Gutachter)

Prof. Dr. Charlotte Förster (3. Prüferin)

MEINER SEHRER

# 1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis .....	4
2.	Abkürzungen .....	6
3.	Zusammenfassung .....	7
4.	Einleitung .....	9
4.1.	Der Schwefelkreislauf .....	10
4.2.	Mikrobielle Sulfidoxidation .....	11
4.3.	Die Sulfid-Chinon Reduktase .....	12
4.4.	Eukaryotische SQR-Proteine und Homologe .....	14
4.5.	Ziele der Arbeit .....	15
5.	Ergebnisse .....	16
5.1.	Versuche zur heterologen Expression des <i>sqr</i> -Gens aus <i>A. aeolicus</i> .....	16
5.2.	Genadaptation und Gensynthese .....	17
5.3.	SQR-Proteinexpression mit Hilfe des <i>casqr</i> -Gens .....	18
5.4.	Biochemische Charakterisierung .....	20
5.4.1.	Einfluss des Histidin-Tags .....	20
5.4.2.	FAD-Gehalt .....	21
5.4.3.	Substrataffinitäten .....	22
5.4.4.	Temperaturabhängigkeit der SQR-Aktivität .....	25
5.4.5.	Thermostabilität der SQR .....	26
5.4.6.	pH-Abhängigkeit der SQR-Aktivität .....	27
5.4.7.	Abhängigkeit der SQR-Aktivität von der Salzkonzentration .....	28
5.4.8.	Redoxtitration des Flavins .....	29
5.5.	Photochemische Charakterisierung .....	31
5.5.1.	Fluoreszenzspektroskopie .....	31
5.5.2.	Bleichung im Starklicht .....	32
5.6.	Sequenzvergleiche .....	33
5.6.1.	Homologien innerhalb der GR-Familie .....	35
5.6.2.	Dimere Organisation der GR-Familie .....	38
5.6.3.	Thermostabile Sulfid-Chinon Reduktasen .....	41
6.	Diskussion .....	44
6.1.	Genadaptation .....	44
6.2.	Heterologe Expression und Reinigung .....	47
6.3.	Spezifische Aktivität und Substrataffinität .....	48
6.4.	FAD-Gehalt des isolierten ASQR-Proteins .....	51
6.5.	Temperaturabhängigkeit der Aktivität und Stabilität .....	52

---

6.6.	Redoxeigenschaften der SQR .....	54
6.7.	Photophysikalische Eigenschaften .....	54
6.8.	Strukturelle Eigenschaften .....	55
7.	Ausblick .....	58
8.	Material und Methoden .....	60
8.1.	Material .....	60
8.1.1.	Organismen .....	60
8.1.2.	Plasmide .....	60
8.1.3.	Chemikalien .....	61
8.1.4.	Medien .....	61
8.1.5.	Antibiotika .....	62
8.2.	Molekularbiologische Methoden .....	62
8.2.1.	Standardmethoden .....	62
8.2.2.	Gensynthese .....	63
8.2.3.	Heterologe Expression in <i>E. coli</i> .....	65
8.2.4.	Heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i> .....	65
8.3.	Biochemische Methoden .....	65
8.3.1.	Bestimmung der Sulfidkonzentration in wässrigen Lösungen .....	65
8.3.2.	Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i> .....	66
8.3.3.	Proteinbestimmung .....	67
8.3.4.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	67
8.3.5.	Western-Blot Analyse .....	67
8.3.6.	Bestimmung des FAD-Gehalts .....	68
8.3.7.	Bestimmung der SQR-Aktivität .....	69
8.3.8.	Redoxtitration .....	70
8.3.9.	Fluoreszenzspektroskopie .....	71
8.4.	Computergestützte Methoden .....	72
8.4.1.	Übersetzung von Proteinsequenzen in DNA Sequenzen .....	72
8.4.2.	Proteinsequenzvergleiche .....	72
8.4.3.	Proteindomänenvergleiche (CDD) .....	72
8.4.4.	Darstellung dreidimensionaler Proteinstrukturen .....	72
9.	Appendix .....	73
9.1.	DNA-Sequenz des synthetischen <i>sqr</i> -Gens ( <i>casqr</i> ) .....	73
9.2.	Oligonukleotidsequenzen für die Gensynthese .....	74
9.3.	Graphische Codon-Gebrauchs Analyse .....	76
10.	Literatur .....	77

## 2. Abkürzungen

A.	<i>Aquifex</i>
Abb.	Abbildung
AHSQR	<i>A. aeolicus</i> SQR-Protein mit N-terminalem sechsfach Histidin-Tag und Enterokinase-Schnittstelle
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ASQR	<i>A. aeolicus</i> SQR-Protein
BCA	Bicinchoninsäure
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
<i>casqr</i>	codon adaptiertes <i>A. aeolicus</i> <i>sqr</i> -Gen
CDD	Conserved Domain Database
Cm	Chloramphenicol
D-AOX	D-Aminosäure-Oxidase
DOM	Dodecylmaltosid
dUQ	Decylubichinon, (2,3-Dimethoxy-5-methyl-6-decyl-1,4-benzochinon)
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ebd.	ebendort
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtSH	2-Thioethanol (Mercaptoethanol)
ET	Elektronentransport
FAD	Flavinadenindinukleotid
FCC	Flavocytochrom <i>c</i>
Fl	Flavin
GR	Glutathion-Reduktase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
kb	Kilobase(n)
Km	Kanamycin
LipDH	Lipoamid-Dehydrogenase
M	mol / Liter
MCS	multiple cloning site
MQ	Menachinon (Vitamin K <sub>2</sub> )
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic acid
<i>O.</i>	<i>Oscillatoria</i>
OD	optische Dichte
<i>P.</i>	<i>Paracoccus</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB ID	Identifikationsnummer für Proteinstrukturen
<i>R.</i>	<i>Rhodobacter</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SQR	Sulfid-Chinon Reduktase
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylendiamin
TRR	Thioredoxin-Reduktase
U	Einheit der SQR-Aktivität: 1 U entspricht 1 $\mu$ mol dUQ-Reduktion pro min
ÜN	über Nacht
wt	Wildtyp

### 3. Zusammenfassung

Biologische Sulfidoxidation findet in Organismen aller drei Domänen des Lebens statt. Dabei ist sowohl eine entgiftende Wirkung als auch eine Rolle in Stoffwechselwegen zur Energiegewinnung denkbar. Im Rahmen unterschiedlicher Genom-Sequenzierungen wurden in Vertretern der Archaeen und der Eukaryoten eine Reihe von Proteinen mit Ähnlichkeit zu bakteriellen Sulfid-Chinon Reduktasen gefunden. Bakterielle SQR-Proteine sind in den beiden letzten Jahrzehnten eingehend biochemisch charakterisiert worden. Zusammen mit Untersuchungen der Thiosulfatstoffwechselwege legen diese biochemischen Charakterisierungen den Schluss nahe, dass SQR-Proteine die entscheidende Rolle für das sulfidabhängige Wachstum spielen. Somit könnten die SQR-Proteine im Stoffwechsel der Prokaryoten vor mehr als zwei Milliarden Jahren von hoher Bedeutung gewesen sein, als die Weltmeere anaerob und stark sulfidisch waren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die SQR aus *Aquifex aeolicus* heterolog in *E. coli* exprimiert und zur Homogenität gereinigt. Dazu wurde ein künstliches Gen synthetisiert, welches an den Codon-Gebrauch von *E. coli* angepasst ist. Die Eigenschaften des gereinigten Enzyms waren denen der in Membranen von *A. aeolicus* charakterisierten SQR-Aktivität sehr ähnlich. Bei der in *E. coli* exprimierten *A. aeolicus* SQR handelt es sich um ein thermostabiles Protein mit einem apparentem Molekulargewicht von 45 kDa, welches, aufgrund seiner hohen Thermostabilität, durch Hitzedenaturierung aus der solubilisierten Membranfraktion des Expressionsorganismus *E. coli* gereinigt werden kann. Rund ein Viertel des heterolog exprimierten Proteins enthielt ein nicht-kovalent an das Enzym gebundenes FAD als prosthetische Gruppe. Mit einem  $K_m$ -Wert von 9,9  $\mu\text{M}$  gegenüber Sulfid liegt das SQR-Protein aus *A. aeolicus* im Größenordnungsbereich der für bakterielle SQR-Proteine bekannten Sulfidaffinitäten. Der Unterschied in den Affinitäten des gereinigten Enzyms gegenüber dUQ und Menadion von 6  $\mu\text{M}$  bzw. 5  $\mu\text{M}$  ist sehr gering. Die spezifische Aktivität bei Raumtemperatur ist mit 3,8 U/mg nur geringfügig größer als der Wert für die Messung in Membranen (3,5 U/mg), nimmt aber mit Erhöhung der Temperatur stark zu (1200 U/mg bei 90°C). Wie für die *R. capsulatus* SQR schon früher beschrieben, konnte auch bei der *A. aeolicus* SQR eine Steigerung der spezifischen Aktivität durch Erhöhung der Salzkonzentration nachgewiesen werden. Die pH-Abhängigkeit der Aktivität ergab ein Optimum bei pH 7,6 und ein zweites lokales Maximum bei pH 5,1. Bei der Redox titration der SQR wurde ein Mittelpunktspotential von -60 mV für den Cofaktor FAD ermittelt. Die Fluoreszenzintensität des Cofaktors FAD konnte durch die Zugabe von Sulfid verringert und durch die anschließende Zugabe von Chinon wieder gesteigert werden.

Durch Vergleiche der Aminosäure-Primärsequenzen unterschiedlicher SQR-Proteine und homologer Proteine wurden deren Ähnlichkeiten zu Vertretern der Glutathion-Reduktase Familie festgestellt. Vor allem der N-terminale Bereich weist Proteindomänen auf, welche aus Lipoamid-Dehydrogenase und Glutathion-Reduktase bekannt sind. Eine den Glutathion-Reduktasen gemeinsame Dimerisierungsdomäne konnte in den Sequenzen der SQR-Proteine nicht identifiziert werden. Ein Vergleich der Sequenzen thermophiler SQR-Proteine brachte keine Hinweise auf eine Stabilisierung der Tertiärstruktur durch ionische Wechselwirkungen.

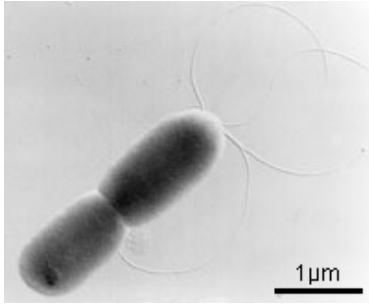
Zur Analyse des unterschiedlichen Codon-Gebrauchs von Genen wurde ein Computerprogramm erstellt, welches unter <http://gcu.schoedl.de> verfügbar ist. Es stellt für jedes Codon eines Genes die Häufigkeit seines Gebrauchs in einem frei wählbaren Expressionsorganismus als Balkendiagramm dar.



## 4. Einleitung

Geschichte jedweder Art kann keine exakte wissenschaftliche Disziplin sein, da sie sowohl vom Erhaltungsgrad der jeweiligen Zeitzeugnisse als auch deren subjektiver Deutung abhängig ist. Wie jeder Stammbaum des Lebens deutlich macht, brachte die Geschichte des Lebens eine zunehmende Vielfalt der Arten von Organismen hervor. Am Anfang stehen die Prokaryoten. Ihre Entwicklungsgeschichte begann vor mindestens 3,5 Milliarden Jahren und sie lebten und entwickelten sich zwei Milliarden Jahre lang vermutlich alleine auf der Erde (Campbell, 1997). Auf Basis des Vergleichs ribosomaler RNA lassen sich zwei Hauptzweige der prokaryotischen Evolution ausmachen: die Domäne der Archaea (Archaeobacteria) und die Domäne der Bacteria (Eubacteria). Die meisten Arten der Archaeobakterien besiedeln extreme Lebensräume wie heiße Quellen und Salzseen. Die weitaus meisten Prokaryoten sind jedoch Eubakterien, welche nahezu jeden Lebensraum auf der Erde erobert haben. Grundlage hierfür sind ihre vielfältigen Ernährungsweisen und Stoffwechselwege (ebd.).

Eine besondere Rolle im Stammbaum des Lebens spielen thermophile Bakterien insbesondere thermophile Archaeen, die dort sehr weit unten, d.h. entwicklungsgeschichtlich sehr früh, anzusiedeln sind. Die Vorläufer allen Lebens auf der Erde könnten diesen noch heute lebenden Arten sehr ähnlich gewesen sein, denn die Lebensbedingungen auf der frühen Erde waren mit denen der Habitate der Extremophilen vergleichbar (Anbar & Knoll, 2002). Die Umweltbedingungen in diesen Lebensräumen waren und sind durch das Vorkommen niedermolekularer anorganischer Verbindungen wie z.B.  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , Thioisulfat und Sulfid, sowie molekularem Wasserstoff und Sauerstoff (in geringen Konzentrationen) geprägt. Im Jahre 1992 beschrieben Huber et al. (1992) ein neues Genus mariner, hyperthermophiler, wasserstoff-oxidierender Bakterien, welches sie *Aquifex* („Wasser-Macher“), nannten (aufgrund einer der Knallgasreaktion analogen Stoffwechselreaktion). Dabei handelt es sich um strikt chemolithoautotrophe Eubakterien mit einem Wachstumstemperaturbereich von 67 bis 95°C (opt. 85°C, Verdopplungszeit 75 min, ebd.). Die Einordnung in die Domäne der Bakterien erfolgte auf Basis von Untersuchungen der 16S rRNA Sequenzen und aufgrund des Vorhandenseins von Murein sowie fettsäurehaltigen Lipiden (Huber et al., 1992). Die am besten beschriebenen Vertreter dieser Ordnung sind *A. pyrophilus* und *A. aeolicus*. Abbildung 4.1. (S. 10) zeigt eine Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle von *A. aeolicus* während der Zellteilung.



**Abb. 4.1. Transmissions-  
Elektronenmikroskopische Aufnahme**

einer Zelle von *Aquifex aeolicus*  
(in Teilung); Platinbedampfung.  
Bild mit freundlicher Genehmigung von  
R. Rachel und K.O. Stetter,  
Universität Regensburg

Mit 1,5 Mbp (Deckert et al., 1998) hat das *A. aeolicus* Genom nur ca. 30% der Größe des Genoms von *E. coli* (4,6 Mbp, Blattner et al., 1997). Die Einschränkung der metabolischen Anpassungsfähigkeit auf strikt chemoautotrophes Wachstum scheint sich auch in der Größe des Genoms wiederzuspiegeln. *A. aeolicus* kann nach heutigem Kenntnisstand nur unter mikroaeroben Bedingungen ( $H_2:CO_2:O_2 = 79,5:19,5:1$ ) mit Sauerstoff als Elektronenendakzeptor wachsen (Deckert et al., 1998).

In der Veröffentlichung der kompletten Genoms von *A. aeolicus* wurde durch BLAST-Sequenzvergleiche (Altschul et al., 1990) ein offener Leserahmen mit Sequenzhomologie (41% Identität) zu bekannten Sulfid-Chinon Reduktasen erkannt. Nübel et al. (2000) fanden bei der Untersuchung von Membranen aus *A. aeolicus* die höchste bislang gemessene spezifische Aktivität für eine sulfidabhängige Reduktion von Chinon in Bakterienmembranen. Heterologe Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung dieser Sulfid-Chinon Reduktase sind Teil dieser Arbeit.

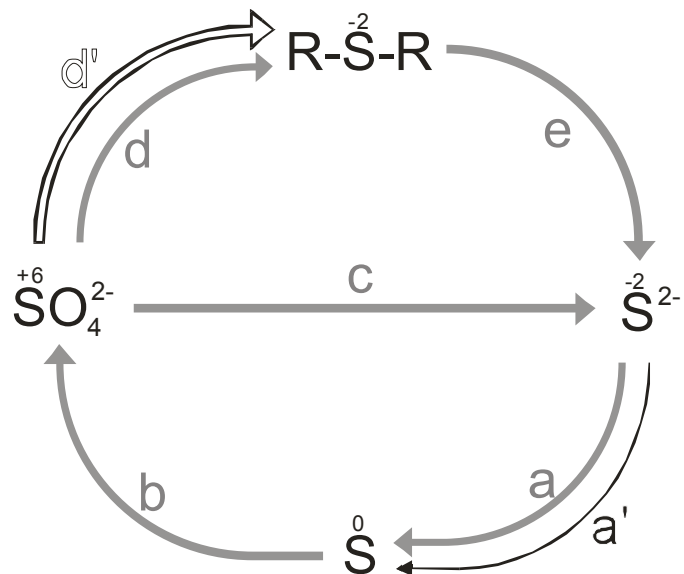
#### **4.1. Der Schwefelkreislauf**

Schwefelverbindungen sind sowohl an assimilatorischen Prozessen als auch an dissimilatorischen Prozessen beteiligt. So spielt das Element Schwefel z.B. beim Aufbau bestimmter Aminosäuren in allen Lebewesen eine essentielle Rolle. Durch die Freisetzung von Schwefel und Schwefelverbindungen aus Vulkanen ( $H_2S$ ,  $SO_x$ ) und aus verwittertem Sediment wie z.B. Gips ( $CaSO_4$ ) oder Bittersalz ( $MgSO_4$ ) gelangt Schwefel in den Boden.

### Abb. 4.2. Der biologische Schwefelkreislauf

Anorganische, reduzierte Schwefelverbindungen werden durch Mikroorganismen zu elementarem Schwefel oder zu Sulfat oxidiert (a, b). Sulfat kann entweder dissimilatorisch (c) oder assimilatorisch (d) von Mikroorganismen reduziert werden.

a' chemische Autooxidation  
 d' pflanzliche Sulfatreduktion  
 e anaerobe Zersetzung  
 R-S-R org. Schwefelverbindungen  
 (modifiziert nach Brock et al., 1997)



Sowohl Bakterien (d) als auch Pflanzen (d') können Schwefel in gelöster Form als Sulfationen ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) aufnehmen und ihn unter Reduktion zum Aufbau essentieller organischer Verbindungen (R-S-R) nutzen (assimilatorische Sulfatreduktion). Sulfid kann einerseits durch anaerobe, mikrobielle Prozesse aus schwefelhaltigen Verbindungen verwesender Organismen freigesetzt werden (e), andererseits kommt es auf natürliche Weise in Folge vulkanischer Aktivität in heißen Quellen vor. Daneben spielt die Sulfatatmung bestimmter Bakterien eine wichtige Rolle für die Bildung von Sulfid in anaeroben Sedimenten (c, dissimilatorische Sulfatreduktion). Reduzierte, anorganische Schwefelverbindungen wie Sulfid, Schwefel und Thiosulfat weisen Redoxpotentiale auf, welche niedrig genug sind, um durch Oxidation Energie für die Zelle zu liefern (a, b, dissimilatorische Sulfid-, Schwefel- und Thiosulfatoxidation) (Brock et al., 1997). Sulfid, die am höchsten reduzierte Form des Schwefels reagiert auch photochemisch mit Luftsauerstoff zu Wasser und elementarem Schwefel (a') (Holleman et al., 1995).

## 4.2. Mikrobielle Sulfidoxidation

Eine Vielzahl chemotropher (Kelly et al., 1997) und phototropher (Brune, 1995) Bakterien ist in der Lage, autotroph unter Verwendung von Sulfid als einziger Elektronenquelle zu wachsen. Daneben sind auch Vertreter der Archaeen in der Lage, Sulfid zu oxidieren (Stetter, 1996). Dabei werden im Rahmen dieser Arbeit alle bei biologische relevanten pH-Werten vorliegenden Formen des Schwefelwasserstoffs in wässriger Lösung ( $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HS}^-$ ) als *Sulfid* bezeichnet (Steudel, 1996).

Die Reduktionsäquivalente des Sulfids können grundsätzlich an zwei verschiedenen Stellen in die Elektronentransportkette der Plasmamembran eingespeist werden: auf der Ebene des Chinon-Pools durch eine Sulfid:Chinon Oxidoreduktase (SQR) oder auf der Ebene des Cytochrom *c* durch eine Sulfid: Cytochrom *c* Oxidoreduktase (FCC). Die Reduktion des NAD<sup>+</sup> durch die Elektronen des Sulfids ist in beiden Fällen endotherm und wird durch eine reverse NADH-Dehydrogenase katalysiert, welche ihre Energie aus dem über die Membran herrschenden elektrochemischen Protonengradienten bezieht. Zwei Mechanismen werden zur Errichtung des Protonengradienten unterschieden: photosynthetischer und chemotropher Elektronentransport. Der erste ist an das Vorhandensein eines bakteriellen, photosynthetischen Reaktionszentrums, der zweite an das eines terminalen Elektronenakzeptors wie Sauerstoff gebunden (vgl. hierzu Griesbeck et al., 2000). Beide treiben über diesen Protonengradienten die ATP-Synthese an.

Die Fähigkeit des FCC, *in vitro* Elektronen aus Sulfid auf Cytochrom *c* zu übertragen (Cusanovich et al., 1991, Visser et al., 1997), und dessen Bedeutung für das sulfidabhängige Wachstum von Bakterien wird kontrovers diskutiert. Denn obwohl FCC in einer Reihe chemo- und phototropher sulfidoxidierender Bakterien nachgewiesen wurde, scheint es für die Oxidation von Sulfid nicht essentiell zu sein, da es bei vielen Sulfidotrophen nicht gefunden wurde. Auch die Inaktivierung des Gens für FCC zeigte keinen Effekt auf das sulfidabhängige Wachstum von *Allochromatium vinosum* (Reinartz et al., 1998). Da bis heute FCC nur in Organismen nachgewiesen werden konnte, welche neben der Sulfidoxidation auch Thiosulfat oxidieren können, ist anzunehmen, dass FCC *in vivo* für die Oxidation von Thiosulfat eine Rolle spielt (Brune, 1995, Friedrich, 1998, Van Driessche et al., 1996, Friedrich et al., 2001).

### 4.3. Die Sulfid-Chinon Reduktase

Knaff und Buchanan (1975) konnten erstmals in Membranen des Grünen Schwefelbakteriums *Chlorobium thiosulfatophilum* die Beteiligung des Chinon-Pools an der sulfidabhängigen NADP<sup>+</sup>-Reduktion nachweisen. In der Folgezeit konnte mit Hilfe chinonanaloger Hemmstoffe die Beteiligung des *bc*-Komplexes am sulfidabhängigen Wachstum der schwefelfreien Purpurbakterien *Rhodobacter sulfidophilus* und *Rhodobacter capsulatus* in Membranen nachgewiesen werden (Brune & Trüper, 1986, Schütz et al., 1997). Auch bei einer Reihe von Cyanobakterien konnte entweder SQR-Aktivität an, aus dem Ursprungsorganismus gereinigtem Protein (*Oscillatoria limnetica*, Arieli et al., 1994), oder an heterolog gereinigtem Protein (*Aphanothece halophytica* Bronstein et al., 2000, *Synechocystis* sp. PCC6803, Shibata H. persönliche Mitteilung) nachgewiesen werden. Neben weiteren, zum Teil auch biochemisch untersuchten Proteinen (Griesbeck et al., 2000)

wurden Gene sequenziert, welche für SQR-Proteine kodieren, zum Beispiel in *Thermosynechococcus elongatus*, *Chlorobium tepidum*, *Anabaena* sp. PCC 7120 und *Bacillus stearothermophilus*. Auch in Vertretern der Archaeen, welche zur Thiotrophie befähigt sind (Stetter, 1996), sind SQR-homologe Gene bekannt (Theissen et al., 2003), deren zugehörige Proteine aber noch nicht biochemisch charakterisiert worden sind.

Alle bisher zur Homogenität gereinigten SQR-Proteine weisen Molekulargewichte um 50 kDa auf und zeigen ein für Flavoproteine charakteristisches Fluoreszenzspektrum mit Anregungsmaxima bei etwa 280, 375 und 450 nm sowie einem Emissionsmaximum bei ca. 520 nm (Griesbeck et al., 2000). Die Fluoreszenzintensität kann durch Zugabe von mikromolaren Mengen Sulfid vermindert und durch darauffolgende Zugabe von Chinon wieder gesteigert werden. Die ermittelten Substrataffinitäten aller charakterisierten SQR-Proteine liegen für Sulfid und verschiedene Chinone im niedrigen, maximal zweistelligen, mikromolaren Bereich. Der größte  $K_m$ -Wert gegenüber Decylubichinon wurde mit 6  $\mu\text{M}$  bei *A. aeolicus* (Nübel et al., 2000) und gegenüber Plastoquinon-1 mit 32  $\mu\text{M}$  bei *O. limnetica* bestimmt (Arieli et al., 1991, Arieli et al., 1994). Der  $K_m$ -Wert gegenüber Sulfid für das kürzlich beschriebene SQR-Analoge aus *Synechocystis* sp. PCC6803 ist dagegen um etwa den Faktor zehn höher (290  $\mu\text{M}$ , Shibata H. persönliche Mitteilung). Für das aus Spalthefe bekannte lösliche Protein HMT2 ist der Wert sogar noch höher. Zwar konnten Werte von 2 mM für Sulfidaffinität (Vande Weghe & Ow, 1999) nicht wiederholt gemessen werden, dennoch ist der  $K_m$ -Wert signifikant größer als die für bakterielle SQR-Proteine bekannten Werte (Shibata H. persönliche Mitteilung). Das primäre Oxidationsprodukt der enzymatischen SQR-Reaktionen ist noch nicht mit Sicherheit bekannt. In Frage kommen bei einer Zweielektronenreaktion elementarer Schwefel und Polysulfane, bei einer Vierelektronenreaktion Thiosulfat. Bei *R. capsulatus*, welcher Elementarschwefel als gelblich-weißen Niederschlag abscheidet, ist die Oxidation des Sulfids nur bis zur Stufe des elementaren Schwefels möglich, bei vielen eukaryotischen Vertretern ist die Oxidation bis zur Stufe von Thiosulfat beschrieben (Grieshaber & Völkel, 1998).

Durch ortsspezifische Mutagenese der SQR aus *R. capsulatus* konnte die Rolle konservierter Aminosäurepositionen biochemisch untersucht werden (Griesbeck et al., 2002). Dabei zeigte vor allem der Austausch von drei in allen bakteriellen SQR-Proteinen konservierten Cysteinen gegen Serin starke Effekte. Jede der drei Einzelmutationen (Cys127Ser, Cys159Ser, Cys353Ser, Nomenklatur gemäß Griesbeck, 2001) führte nahezu zur vollständigen Inaktivierung der reduktiven Halbreaktion, also der sulfidabhängigen Reduktion von FAD (ebd.). Zwei der drei Cysteinpositionen (Cys159, Cys353) sind auch in eukaryotischen und archaeellen SQR-Homologen konserviert. Ebenso unterscheiden sich viele bakterielle SQR-Proteine von ihren eukaryotischen und archaeellen Homologen an der Position Valin 300. Der Großteil der bakteriellen Vertreter weist dort ein Valin auf,

wohingegen Vertreter der beiden anderen Domänen dort ein stark konserviertes Aspartat zeigen. Allen beiden Gruppen ist ein konserviertes Glycin an der Position 299 gemeinsam (Theissen et al., 2003). Eine Mutation des Valin 300 der *R. capsulatus* SQR zu Aspartat führte zu einer Erhöhung des  $K_m$ -Wertes für Sulfid von 5  $\mu\text{M}$  auf über 400  $\mu\text{M}$  (Griesbeck et al., 2002). Dies ist im Einklang mit den bekannten Werten für Sulfidaffinität des Proteins SLR0876 von *Synechocystis* sp. PCC68003 (290  $\mu\text{M}$ , Shibata H. persönliche Mitteilung) und von HMT2 aus *S. pombe* (~ 2 mM, Vande Weghe & Ow, 1999), welche beide an der entsprechenden Position ein Aspartat besitzen.

#### 4.4. Eukaryotische SQR-Proteine und Homologe

Auch in Vertretern der Eukaryoten konnte eine Kopplung der Sulfidoxidation mit der ATP-Synthese gefunden werden. So werden z.B. in den Mitochondrien des Wattwurms *Arenicola marina* die Elektronen des Sulfids über den  $bc_1$ -Komplex in die bakterielle Elektronentransportkette eingespeist (Grieshaber & Völkel, 1998). Gleiches ist für die Muschel *Geukensia demissa* nachgewiesen (Parrino et al., 2000), wohingegen die Elektronen aus Sulfid bei der Muschel *Solemya reidi* auf der Ebene von Cytochrom *c* eingespeist werden (O'Brien & Vetter, 1990). Auch die beiden Borstenwürmer *Marenzelleria viridis* und *Hediste diversicolor* können die enzymatische Sulfidoxidation mit der oxidativen Phosphorylierung koppeln (Hahlbeck et al., 2000). Assimilatorische Sulfidoxidation konnte jüngst auch in Organismen und in Geweben von Organismen nachgewiesen werden, deren natürliche Habitate keine erhöhten Sulfidkonzentrationen aufweisen. So wurde ein funktionales mitochondrielles SQR-homologes Gen aus *Schizosaccharomyces pombe* kloniert und das Protein exprimiert, gereinigt und biochemisch beschrieben, welches neben der Fähigkeit zur Sulfidoxidation auch Sequenzähnlichkeit zu den bakteriellen SQR-Proteinen zeigt (Vande Weghe & Ow, 1999). Desweiteren wurde für die Mitochondrien aus Hühnerleber eine sulfidabhängige ATP-Produktion beschrieben (Yong & Searcy, 2001). Mit Hilfe der Endosymbiontentheorie kann sowohl die mitochondrielle Lokalisation als auch die Homologie zu proteobakteriellen SQR-Proteinen erklärt werden. Theissen et al. (2003) nimmt an, dass die eukaryotischen SQR-homologen Proteine von einem einzigen bakteriellen Vorläufer abstammen und möglicherweise nicht in der ATP-Produktion, sondern bei der Entgiftung von Sulfid eine wichtige Rolle spielen.

Aus der phylogenetisch weiten Verbreitung und dem Vorkommen in Vertretern der untersten Abzweigungen im Stammbaum des Lebens lässt sich schließen, dass es sich bei der SQR und ihren Homologen um Proteine handelt, welche schon kurz nach der Entstehung des Lebens eine wichtige Rolle gespielt haben. Eine Gruppierung der SQR-Proteine in Unterklassen wird aber erst nach einer ebenso eingehenden Charakterisierung der

eukaryotischen und archaeellen Vertretern geschehen können, wie dies für die bakteriellen SQR-Proteine schon geschehen ist. Möglicherweise bringt eine solche Klassifizierung eine Unterscheidung in Proteine zur Entgiftung von Sulfid, und in Proteine für sulfidabhängiges Wachstum mit sich.

#### **4.5. Ziele der Arbeit**

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Etablierung eines heterologen Expressionssystems für die SQR aus *A. aeolicus* und deren biochemische Charakterisierung. Die phylogenetische Position des Organismus *A. aeolicus* im Wurzelbereich der Domäne der Bakterien und sein außergewöhnlich hohes Optimum der Wachstumstemperatur ließen die Untersuchung des SQR-Enzyms im isolierten Zustand als sehr lohnend erscheinen.

## 5. Ergebnisse

Die Kultivierung von *A. aeolicus* ist mit einem großen experimentellen und finanziellen Aufwand verbunden (Huber et al., 1992). Ferner sind Methoden für die molekularbiologische Modifizierung für Vertreter der Ordnung der *Aquificales* noch nicht beschrieben. Insofern war die Etablierung eines heterologen Expressionssystems für eine umfassende biochemische Charakterisierung der SQR aus *A. aeolicus* unumgänglich.

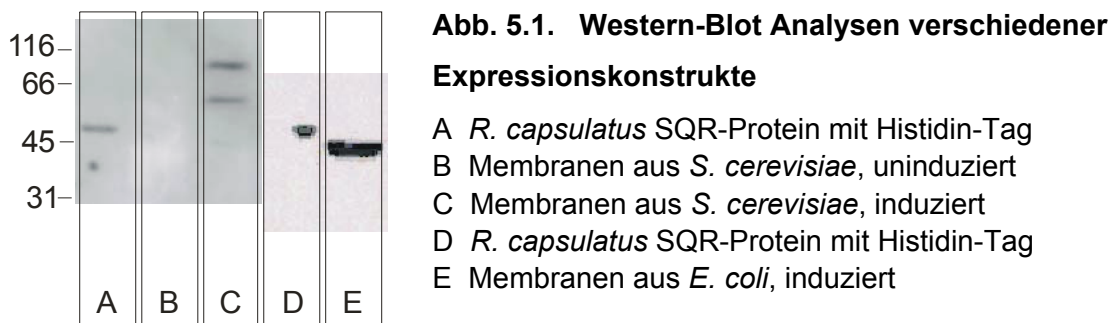
### 5.1. Versuche zur heterologen Expression des *sqr*-Gens aus *A. aeolicus*

Die freie Verfügbarkeit der Sequenzinformationen des kompletten Genoms von *A. aeolicus* (Deckert et al., 1998) erleichterte die Amplifikation des natürlichen *sqr*-Gens durch PCR aus genomischer *A. aeolicus* DNA. In Analogie zu den beschriebenen Expressionskonstrukten für die heterologe Expression des *Rhodobacter capsulatus* SQR-Proteins in *E. coli* (Griesbeck, 2001) wurden N-terminal Codons für einen Histidin-Tag aus sechs Histidinen und eine Enterokinase-Schnittstelle durch PCR an das natürliche *A. aeolicus* *sqr*-Gen angefügt (Schödl, 2000). Zur Expression wurde dieses Konstrukt in unterschiedliche Expressionsvektoren kloniert, und diese Vektoren wurden in *E. coli*-Expressionsstämme eingebracht. Alle von Schödl (2000) beschriebenen *E. coli*-Expressionskonstrukte, lieferten, wenn überhaupt, nur Anzeichen für sehr geringe Proteinexpressionsraten. Die geringen Proteinmengen konnten nur durch Western-Blot Analyse nachgewiesen werden, und somit kamen diese Expressionssysteme für eine Reinigung des Proteins, in zur biochemischen Charakterisierung nötigen Mengen, nicht in Frage.

Zunächst wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit analoge Expressionskonstrukte für die heterologe Expression in *S. cerevisiae* erstellt. Das N-terminal erweiterte *sqr*-Konstrukt aus pTHASQR (Schödl, 2000) wurde durch Einführung der geeigneten Restriktionsschnittstellen mithilfe der PCR in den Expressionsvektor pYES2 eingefügt (pYES2-*sqr*). Nach Überprüfung durch Sequenzierung wurde das Konstrukt durch Elektroporation in den *S. cerevisiae* Expressionsstamm K699 (W303) eingeführt, und die Expression induziert. Auch in diesem System zeigten sich nur in Western-Blot Analysen mit Histidin-Tag Antikörper induzierte Proteine, welche aber nicht der erwarteten Größe entsprachen. Abbildung 5.1. C zeigt für ein Hefe-Expressionskonstrukt Banden bei ca. 60 und 80 kDa welche um mindestens 10 bzw. 30 kDa größer sind, als die theoretisch zu erwartende Bande von 47 kDa. In Abbildung 5.1. E zeigt sich zumindest eine einzelne Bande von nahezu erwarteter Größe (45 kDa). Da



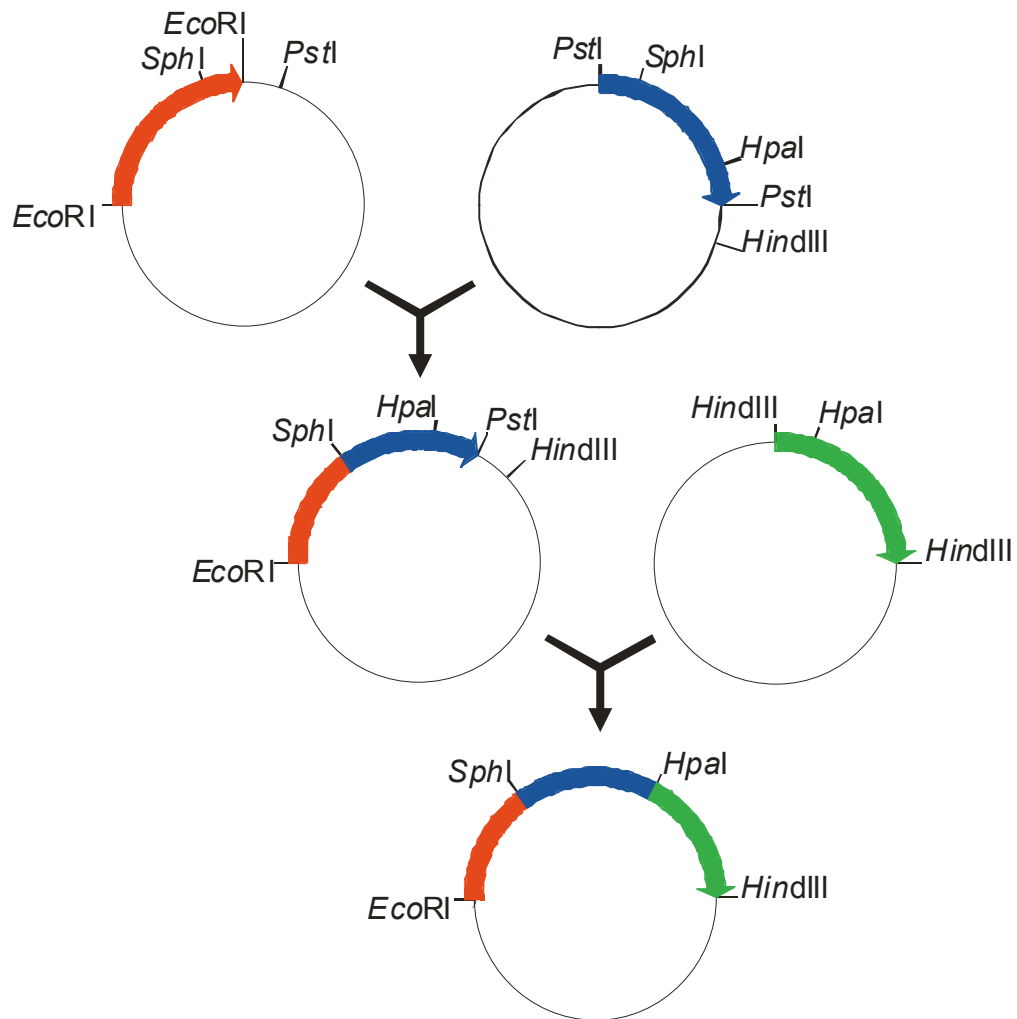
diese Bande in der Coomassie-Färbung des SDS-PAGE-Gels nicht als prominent erkennbar war, wurde nicht versucht das Protein über Affinitätschromatographie zu reinigen.



Da es ferner nicht gelang, in isolierten Membranen der gewählten Expressionssysteme SQR-Aktivität nachzuweisen und da nicht zu erwarten war, dass aus den gewählten Expressionssystemen SQR-Protein im Milligrammmaßstab zu reinigen ist, wurde im Folgenden eine neue Vorgehensweise gewählt.

## 5.2. Genadaptation und Gensynthese

Ein Vergleich des Codon-Gebrauchs des *A. aeolicus* *sqr*-Gens und des Codon-Gebrauchs im Gesamtgenom von *E. coli* zeigte, dass sich die niedrigen Proteinexpressionsraten möglicherweise durch den unterschiedlichen präferenziellen Codon-Gebrauch ergeben könnten. So wurde unter Anwendung des *backtranslate* Computerprogramms (vgl. Kap. 8.4.1, S. 72) der Firma Entelechon die Aminosäuresequenz des *A. aeolicus* SQR-Proteins in eine an den Codon-Gebrauch von *E. coli* angepasste DNA-Sequenz übersetzt. Unter Erhalt des Leserahmens und der Proteinsequenz wurden zur Klonierung einzigartige DNA-Restriktionsschnittstellen sowie ein N-terminaler sechsfach Histidin-Tag und eine Enterokinase-Schnittstelle eingeführt. Dieses synthetische Gen wurde *casqr* genannt (codon adaptiertes *A. aeolicus* *sqr*-Gen). Das insgesamt 1338 bp lange *casqr*-Gen wurde mittels der von Fuhrmann et al. (1999) beschriebenen Methode in drei Fragmenten aus Oligonukleotidbausteinen synthetisiert. Die in den primären Synthesereaktionen entstandenen Ligationsprodukte wurden mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide amplifiziert und nach Restiktionsverdau in den Klonierungsvektor pUC18 ligiert. Durch Sequenzierung der Klone, welche je eines der Fragmente 1, 2 oder 3 im Klonierungsvektor pUC18 enthielten, wurden diejenigen Klone identifiziert, welche die korrekte DNA-Sequenz enthielten. Von diesen Klonen wurden Glycerinkulturen angelegt. Das Vollängen *casqr*-Gen wurde durch Ligationen der Fragmente 1 bis 3 gemäß folgendem Schema erhalten:



**Abb. 5.2. Klonierungsschema des Vollständigen *casqr*-Gens**

Als Klonierungsvektor wurde pUC18 verwendet. Der Ausgangsvektor mit **Fragment 1** (459 bp) wurde *SphI*-*PstI* verdaut und mit dem ebenso verdauten **Fragment 2** (511 bp) ligiert. An das so erhaltene Konstrukt wurde das **Fragment 3** (509 bp) nach Restriktion mit *HpaI* und *HindIII* angefügt. (vgl. Kap. 8.2.2, S. 63)

Das aus den Fragmenten zusammengesetzte *casqr*-Gen im pUC18 Vektor wurde mittels *EcoRI* und *HindIII* in den *E. coli*-Expressionsvektor pMAL-c2X eingebracht. Der entstandene Vektor wurde pMAL-*casqr* genannt und enthielt vor dem 5'-Ende des *casqr*-Gens ein für Maltosebindepotein kodierendes Gen zur Reinigung des Proteins über Affinitätschromatographie.

### 5.3. SQR-Proteinexpression mit Hilfe des *casqr*-Gens

*E. coli* BL21(DE3) Zellen wurden mit dem Expressionsvektor pMAL-*casqr* transformiert und auf Expression getestet. Dazu wurden 2 ml Kulturen von unterschiedlichen Klonen mit 1 mM IPTG für 3 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert, und die geernteten Zellen in SDS-

Probenpuffer für 5 min bei 95°C aufgekocht. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel (12%) aufgetragen, und das Gel wurde nach der Elektrophorese mit Coomassie gefärbt (Abb. 5.3.). Hier zeigten sich prominente Banden der zu erwartenden Größe des Fusionsproteins aus *A. aeolicus* SQR und Maltosebindeprotein (90 kDa, nicht gezeigt).

Um eine eventuell störende Rolle des großen Maltosebindeproteins (42 kDa) im Weiteren zu umgehen, wurde im nächsten Schritt versucht, das *casqr*-Gen in einen Expressionvektor zu klonieren, der auch für die Reinigung der aus *R. capsulatus* stammenden SQR aus *E. coli* verwendet wurde (Griesbeck, 2001). Das *casqr*-Gen wurde durch Einführung geeigneter Schnittstellen mittels PCR in den Expressionvektor pET11a kloniert und durch Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft. Der so erhaltene Vektor wurde pET11a-casqr genannt, und zur Expression wurde *E. coli* BL21(DE3) mit diesem Plasmid transformiert. Auch in diesem Fall zeigten sich in der Coomassie-Färbung der SDS-PAGE-Analyse ganzer Zellen prominente Banden der zu erwartenden Größe (47 kDa, Abb. 5.4. B+) des N-terminal um sechs Histidine und eine Enterokinase-Schnittstelle ergänzten SQR-Proteins. Wie in Kapitel 8.3.2 (S. 66) beschrieben wurde im Folgenden eine 2 l Kultur angezogen, und SQR-Protein durch Hitzedenaturierung aus der isolierten und solubilisierten Membranfraktion gereinigt. Das gereinigte Protein zeigte in einem ersten Vorversuch Sulfid-Chinon Reduktase Aktivität. Da der sechsfach Histidin-Tag und die Enterokinase-Schnittstelle nun zur Reinigung nicht mehr nötig waren, wurde ein weiterer Expressionsvektor, basierend auf dem pET11a Plasmid, kloniert. Er wurde pET11a-casqr2 genannt und enthielt das um 11 Codons im 5'-Bereich verkürzte *casqr*-Gen, welche im pET11a-casqr den Histidin-Tag und die Enterokinase-Schnittstelle kodierten.

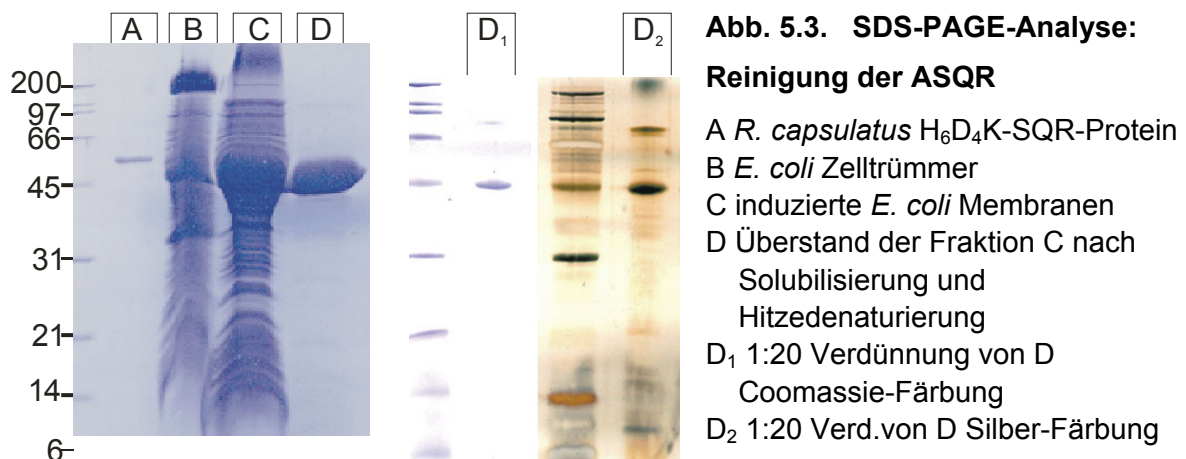


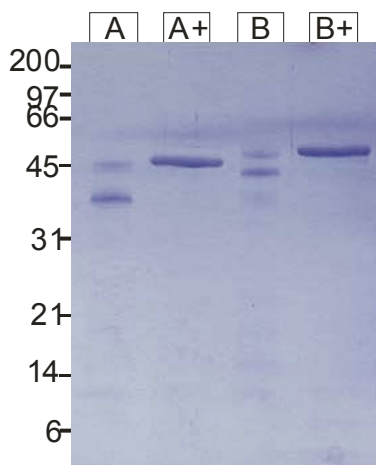
Abbildung 5.3. zeigt die Reinigung der ASQR aus *E. coli*. Sowohl in der Coomassie-Färbung der Zelltrümmer (B) und Membranen (C) von *E. coli* ist eine prominente Bande bei 45 kDa zu erkennen. Nach Solubilisierung der Membranen mit dem Detergenz Thesit und anschließender Hitzedenaturierung war das thermostabile ASQR-Protein in hohen

Konzentrationen im Überstand zu finden. Die Analyse der gereinigten ASQR durch SDS-PAGE mit Silber-Färbung wies eine zweite Bande bei ca. 85 kDa auf (Abb. 5.3. D<sub>2</sub>). Hierbei könnte es sich um das Homodimer der SQR handeln.

## 5.4. Biochemische Charakterisierung

### 5.4.1. Einfluss des Histidin-Tags

Um zu untersuchen, ob der Histidin-Tag einen Einfluss auf die Eigenschaften der SQR hat, wurde Protein mit N-terminalem Histidin-Tag (AHSQR) und Wildtyp-Protein (ASQR) unter gleichen Bedingungen (Hitzedenaturierung) gereinigt.



**Abb. 5.4. SDS-PAGE**

#### Vergleich von ASQR und AHSQR

A gereinigte ASQR, EtSH-freier Probenpuffer  
A+ gereinigte ASQR, EtSH-haltiger Probenpuffer

B gereinigte AHSQR, EtSH-freier Probenpuffer  
B+ gereinigte AHSQR, EtSH-haltiger Probenpuffer

EtSH: Mercaptoethanol

Die SDS-PAGE-Analyse der durch Hitzedenaturierung gereinigten Proteine ASQR und AHSQR zeigte einen deutlichen Unterschied für die apparenten Molekulargewichte. Der Einfluss von Mercaptoethanol im SDS-Probenpuffer auf die vollständige Entfaltung des Proteins konnte für beide Proteine gezeigt werden. Nur in Gegenwart von EtSH trat im Gel eine Einzelbande auf. Die in Abbildung 5.3. D<sub>2</sub> bei 90 kDa in der Silber-Färbung erkennbare Dimerbande, war dagegen nicht von der Zugabe an Mercaptoethanol abhängig.

Für beide heterolog exprimierten Proteine ASQR und AHSQR wurde bei Raumtemperatur die gleiche spezifische Aktivität gemäß Griesbeck (2001) von 3,8 U/mg mit dUQ bestimmt. Somit ist kein Einfluss des Reinigungs-Tags auf die spezifische Aktivität messbar. Für die Messung der spezifischen Aktivität in Membranen von *A. aeolicus* ergab sich trotz des geringeren Reinheitsgrades des Proteins in Membranen ein vergleichbarer Wert von 3,5 U/mg (Nübel et al., 2000, 20°C). Folglich ist die geringe spezifische Aktivität nach dem Herauslösen aus der natürlichen Membrenumgebung teilweise auf die unnatürliche Detergenzumgebung zurückzuführen. Ein weitaus größerer Grund für die geringe spezifische Aktivität ist der im nächsten Kapitel beschriebene geringe FAD-Gehalt.

### 5.4.2. FAD-Gehalt

Aus der ASQR wurde mit der von Engels et al. (1997) beschriebenen Methode (Schwefelsäuremethode, Kap. 8.3.6.2, S. 68) FAD extrahiert. So konnte gezeigt werden, dass auch die aus *A. aeolicus* stammende SQR nicht kovalent an das Protein gebundenes FAD enthält. Durch Rekonstitution des D-AOX-Apoproteins konnte der FAD-Gehalt des Extraktes quantitativ bestimmt werden (Kap. 8.3.6.3, S. 69). Für den Gehalt an FAD ergaben sich dabei Werte von 10% bis 25% bezogen auf das SQR-Monomer. Dies ist im Einklang mit den von Griesbeck (2001) gefundenen Werten für das heterolog exprimierte *R. capsulatus* SQR-Protein.

Da bei der Verwendung der Schwefelsäuremethode zur Extraktion des FAD nicht ausgeschlossen werden kann, dass das Protein beim Denaturierungsprozess FAD in das Proteinpellet miteinschließt, wurde versucht, FAD aus dem SQR-Protein schonender freizusetzen. Dazu wurde das Protein mit der unspezifischen Proteinase Pronase behandelt (Kap. 8.3.6.2, S. 68). In SDS-PAGE-Analysen der Verdauungsansätze nach unterschiedlich langer Inkubation, konnten keine Anzeichen für einen Abbau des Proteins gefunden werden. Deshalb konnte diese Methode nicht für die Bestimmung des FAD-Gehaltes verwendet werden.

Der FAD-Gehalt lässt sich auch aus dem Absorptionsunterschied von reduzierter und oxidiert Form des SQR-Proteins abschätzen. Für proteingebundenes und freies FAD sind folgende molare dekadische Extinktionskoeffizienten bekannt:

	oxidierte Form $\varepsilon$ [mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	reduzierte Form $\varepsilon$ [mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
GR <i>H. sapiens</i>	11,3 bei 463 nm *	-
LipDH <i>S. scrofa</i> (Schweineherz)	11,1 bei 450 nm #	1,2 bei 450 nm #
Trypanothion-Reduktase <i>T. cruzi</i>	11,3 bei 461 nm *	-
Trypanothion-Reduktase <i>C. fasciolata</i>	11,3 bei 464 nm *	-
FAD in wässriger Lösung	12,5 bei 454 nm §	1,57 bei 450 nm §

\* aus Williams Jr., 1992, S. 190

# aus Williams Jr., 1992, S. 124

§ aus Hooper et al., 1996

§ aus Müller, 1991, S. 44

Unter der Annahme, dass sich die Extinktionskoeffizienten im SQR-Protein nicht maßgeblich von den hier aufgeführten unterscheiden, kann man aus den Differenzspektren der Redox Titration (Abb. 5.12. A, S. 29) den FAD-Gehalt berechnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dabei mit einem differentiellen molaren dekadischen Absorptionskoeffizient von

$10 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  gerechnet, der sich aus dem Durchschnitt der oben angegebenen Werte ergibt. Bei einer Proteinkonzentration von  $0,5 \text{ mg/ml}$  ergibt sich bei  $450 \text{ nm}$  ein Unterschied von  $0,035 \text{ OD}$  zwischen vollkommen oxidiertes und vollkommen reduziertes Form des FAD-Moleküls. Dieser entspricht einer FAD-Konzentration von  $0,0035 \text{ mM}$  ( $\epsilon = 10 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Die Proteinkonzentration von  $0,5 \text{ mg/ml}$  des ASQR-Proteins beträgt umgerechnet  $0,0105 \text{ mM}$  (Molekulargewicht  $47449 \text{ kDa}$ , vgl. Kap. 6.2, S. 47). Somit zeigt auch die Auswertung der spektroskopischen Daten der Redox Titration, dass lediglich ein Drittel der SQR-Proteine den Cofaktor FAD enthalten.

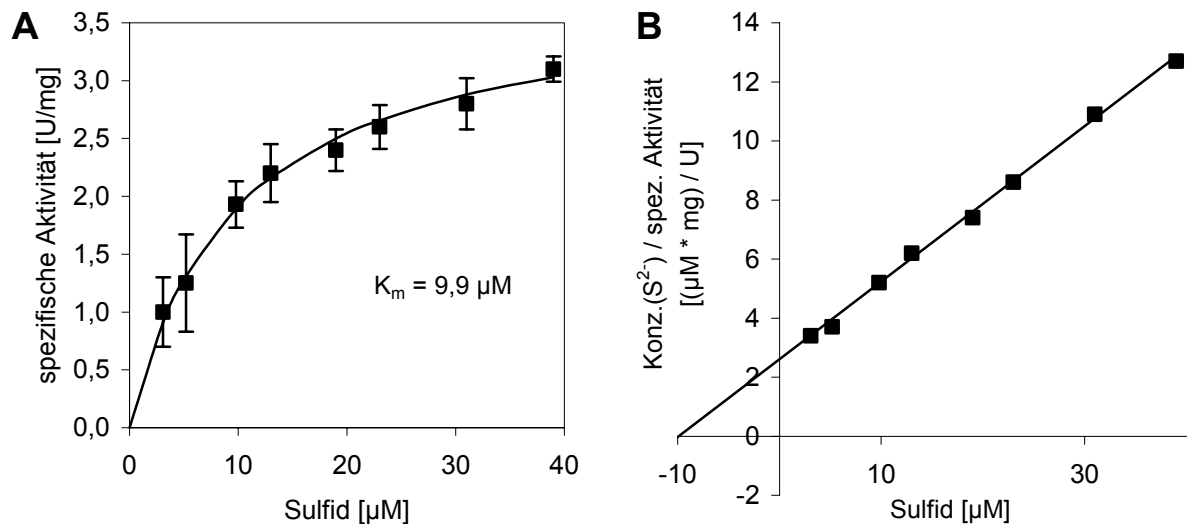
Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass sich die geringe spezifische Aktivität des gereinigten Proteins durch den niedrigen FAD-Gehalt ergibt. Bei einem Cofaktor zu Proteinverhältnis von 1 zu 1 dürfte der Wert für die spezifische Aktivität deutlich höher liegen, als im Kapitel 5.4.1 angegeben ( $3,8 \text{ U/mg}$  bei Raumtemperatur, S. 20). Nimmt man an, dass nach der Reinigung noch ein Drittel aller SQR-Enzyme den Cofaktor beinhalten, würde sich ein Wert von  $11,4 \text{ U/mg}$  ergeben. Bei einem noch geringeren Wert für den FAD-Gehalt von beispielsweise nur  $10\%$ , wie er mit dem enzymatischen Test ermittelt worden ist, würde sich eine spezifische Aktivität von  $38 \text{ U/mg}$  ergeben.

### 5.4.3. Substrataffinitäten

Für bakterielle Sulfid-Chinon Reduktasen wurden  $K_m$ -Werte für Sulfid und Chinon im mikromolaren Bereich bestimmt (Griesbeck et al., 2000). Auch für die *A. aeolicus* SQR lagen dementsprechende Werte aus der Charakterisierung in Membranen vor (Nübel et al., 2000). Für das gereinigte ASQR-Protein wurden sie im Rahmen dieser Arbeit bestimmt.

#### 5.4.3.1. $K_m$ -Wert für Sulfid

Die Affinität gegenüber Sulfid wurde in Membranen zu  $11 \text{ }\mu\text{M}$  bestimmt (Nübel et al., 2000). Bei den hier durchgeführten Messungen am isolierten Enzym ergab sich einen  $K_m$ -Wert von  $9,9 \text{ }\mu\text{M}$  für die Affinität gegenüber Sulfid (Abb. 5.5.).



**Abb. 5.5. Substrataffinität der ASQR gegenüber Sulfid**

**A** Auftragung nach Michaelis Menten

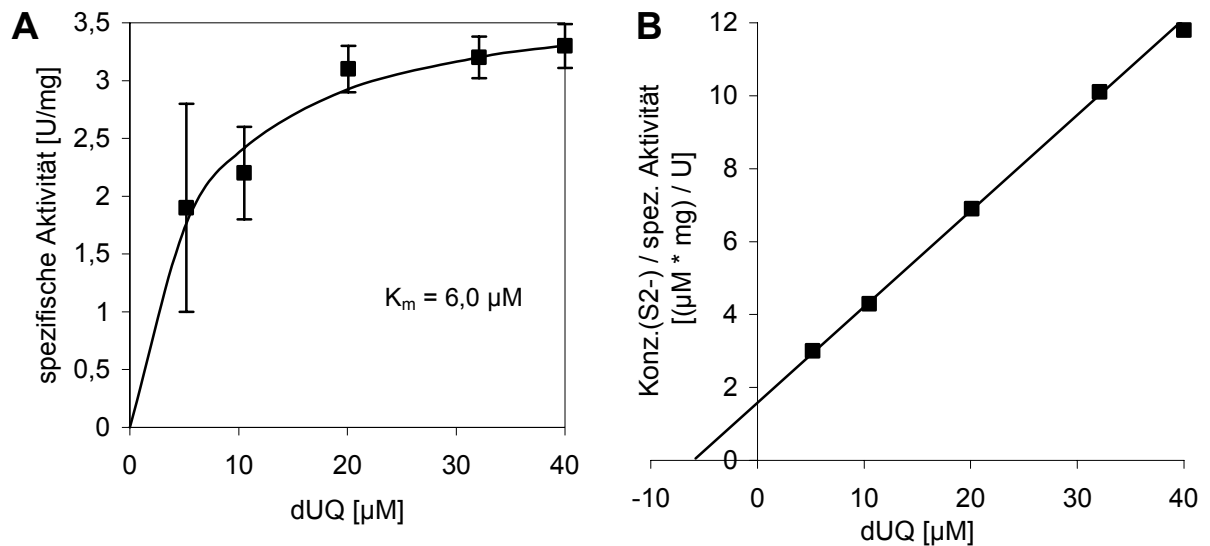
**B** linearisierte Auftragung nach Hanes (1932)

Die Messungen erfolgten bei 25°C

Somit liegt der Wert für das isolierte ASQR-Protein im Größenordnungsbereich der für bakterielle SQR-Proteine beschriebenen Affinität gegenüber Sulfid (5 µM für *R. capsulatus* Schütz, 1997, 26 µM für *P. denitrificans* Schütz et al., 1998b).

#### 5.4.3.2. $K_m$ -Wert für Decylubichinon

Sowohl für die Bestimmung der Substrataffinitäten gegenüber Sulfid, als auch für die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten, wurde als exogener Elektronenakzeptor dUQ verwendet. Im Gegensatz zu den in den Bakterienmembranen natürlich vorkommenden Chinonen ist es in Wasser noch bis mindestens 40 µM löslich. Natürliche Chinone weisen, aufgrund der langen unpolaren Seitenkette, eine viel geringere Löslichkeit in wässrigen Systemen auf und können daher nicht sättigend eingesetzt werden.



**Abb. 5.6. Substrataffinität der ASQR gegenüber dUQ**

**A** Auftragung nach Michaelis Menten

**B** linearisierte Auftragung nach Hanes (1932)

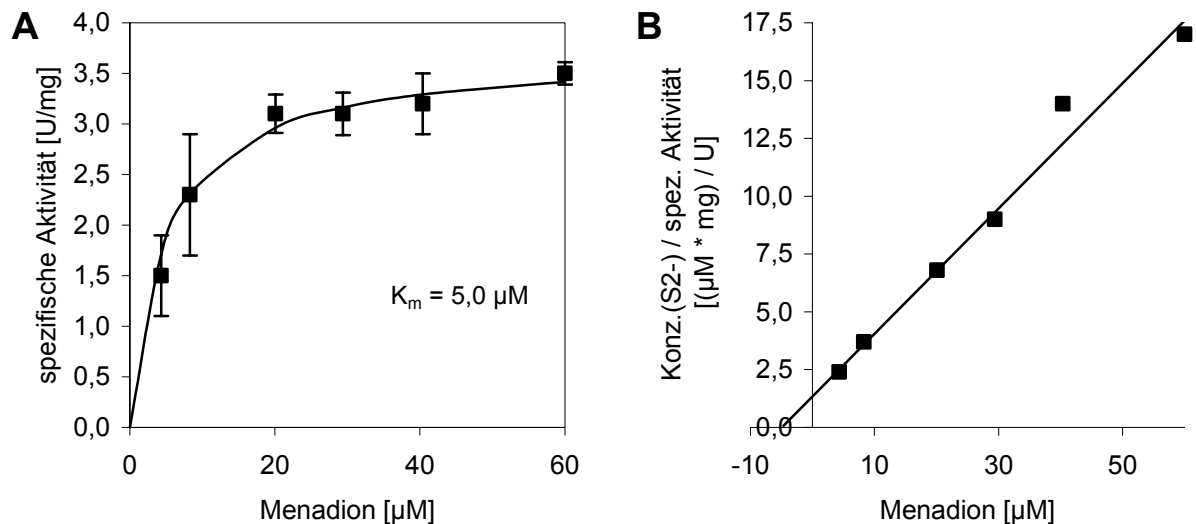
Die Messungen erfolgten bei 25°C

Die hier durchgeführten Experimente ergaben einen Wert von 6,0 µM für die Affinität gegenüber dUQ (Abb. 5.6.), der nur gering vom in Membranen gefundenen Wert (5 µM, (Nübel et al., 2000) abweicht und in den für bakterielle SQR-Enzyme bekannten Größenordnungsbereich passt.

#### 5.4.3.3. $K_m$ -Wert für Menadion

Als natürlich in *A. aeolicus* vorkommender Elektronenakzeptor wird Menachinon angenommen (Schütz et al., 2003). Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Naphtochinone mit langer Isoprenseitenkette wurde in den hier durchgeführten Experimenten mit Menadion gearbeitet. Menadion wird auch als Menachinon-0 bezeichnet und stellt ein analoges chinoides System ohne Isoprenseitenkette dar. Für die Affinität gegenüber Menadion ergab sich ein  $K_m$ -Wert von 5 µM.





**Abb. 5.7. Substrataffinität der ASQR gegenüber Menadion**

**A** Auftragung nach Michaelis Menten

**B** linearisierte Auftragung nach Hanes (1932)

Die Messungen erfolgten bei 25°C

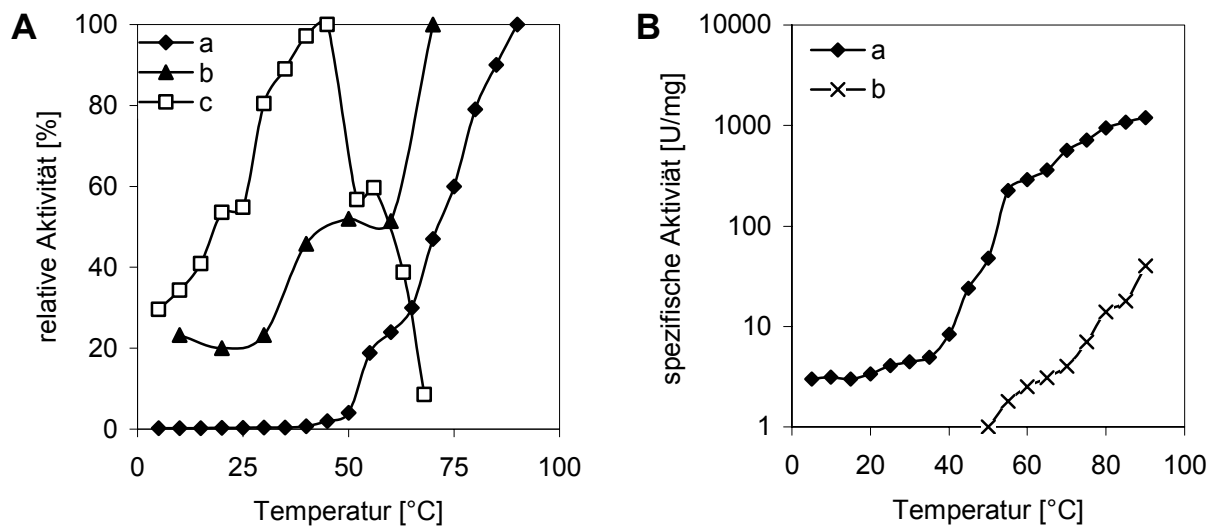
Nach Auswertung der Messungen (Abb. 5.7.) ergab sich also für dUQ ein  $K_m$ -Wert von 6 µM und für Menadion ein  $K_m$ -Wert von 5 µM. Obwohl der Wert für das dem *Aquifex* Chinon analoge Menadion kleiner ist, ist unter Berücksichtigung der Messgenauigkeit keine Präferenz für einen der beiden Elektronenakzeptoren feststellbar.

#### 5.4.4. Temperaturabhängigkeit der SQR-Aktivität

Die Messung der Temperaturabhängigkeit der *A. aeolicus* SQR-Aktivität ist von Nübel et al. (2000) mit isolierten Membranen durchgeführt worden. Erst die Zugänglichkeit eines heterolog exprimierten Proteins machte es möglich, die Thermostabilität außerhalb der natürlichen Membran in der künstlichen Detergenzumgebung zu untersuchen. Die Aminosäuresequenz der ASQR ist zu der aus anderen Eubakterien bekannten SQR-Proteinsequenzen zu ca. 35% identisch. Trotz der hohen Identität weist das *A. aeolicus* SQR-Enzym in Anpassung an das Habitat ein Temperaturoptimum von über 90°C auf (Abb. 5.8., S. 26).

Für die Messung der Temperaturabhängigkeit wurde ein Thermostatenbad über isolierte Zuleitungen mit der thermostatisierbaren Küvettenhalterung eines Diodenarrayphotometers verbunden. Der externe Temperaturfühler des Thermostaten war in die Küvettenhalterung integriert, so dass die Heizautomatik des Thermostaten die Temperatur direkt an der Küvettenhalterung regelte. Der begaste Puffer wurde vortemperiert, und der Messansatz wurde in der Küvettenhalterung vor Beginn der Messung für zirka drei Minuten inkubiert. Für Temperaturen oberhalb von 60°C wurde der Thermostat anstelle von Wasser mit Silikonöl

(M5, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) betrieben, da es mit Wasser nicht möglich war, die Küvettenhalterung auf über 75°C zu temperieren.



**Abb. 5.8. Temperaturabhängigkeit Aktivität der ASQR**

**A** Darstellung bezogen auf die maximale Aktivität. Die chemische Hintergrundreaktion wurde für 50 bis 90° bestimmt und abgezogen (siehe **B**).

a SQR-Aktivität des gereinigten ASQR-Proteins (diese Arbeit)

b SQR-Aktivität in Membranen von *A. aeolicus* (Daten aus Nübel et al., 2000)

c SQR-Aktivität des gereinigten *R. capsulatus* SQR-Proteins (Daten aus Griesbeck, 2001)

**B** logarithmische Auftragung der spezifischen Aktivität

a SQR-Aktivität des gereinigten ASQR-Proteins

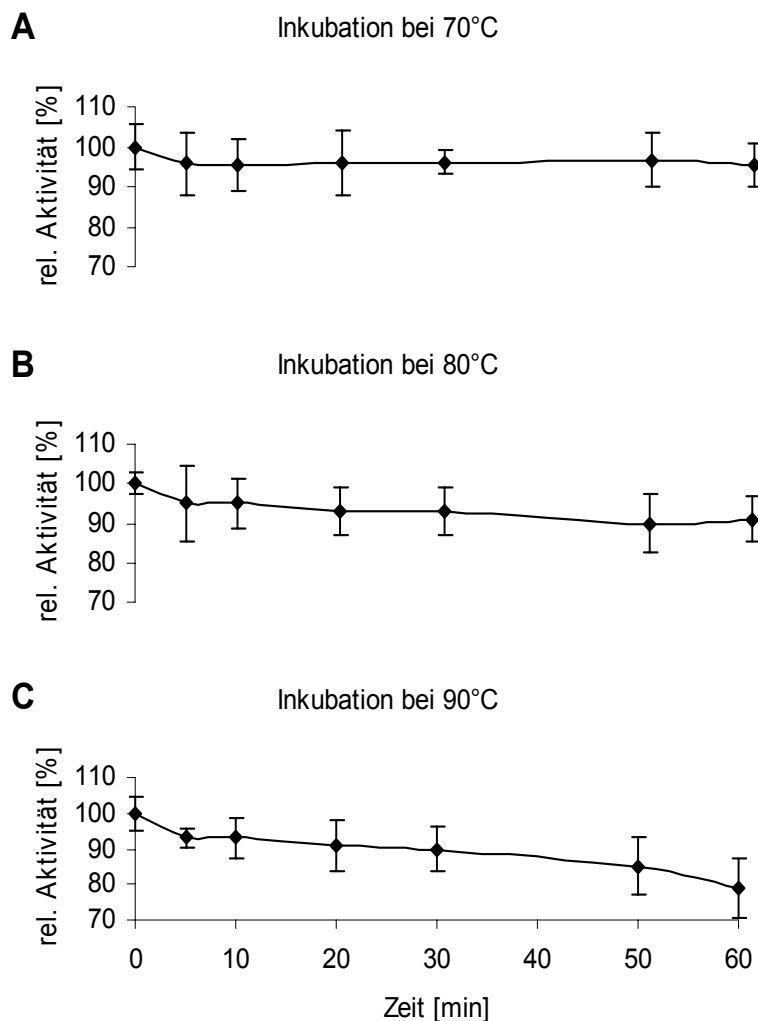
b chemische Hintergrundreaktion

Nach Abzug der chemischen Hintergrundreaktion ist die stärkste Zunahme der spezifischen Aktivität für den Bereich zwischen 40 und 60°C zu verzeichnen (Abb. 5.8.). Ab ca. 80°C nimmt die Aktivität nur noch geringförmig weiter zu. Auch bei Durchführung der Reaktion bei 90°C ist es zu keinem Abfallen der spezifischen Aktivität gekommen. Werte oberhalb von 90°C konnten aus experimentellen Gründen nicht reproduzierbar gemessen werden. Der höchste gemessene Wert für die spezifische Aktivität des isolierten ASQR-Proteins ergab sich bei 90°C zu 1200 U/mg.

#### 5.4.5. Thermostabilität der SQR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Thermostabilität des ASQR-Proteins bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Schon die Möglichkeit zur funktionellen Reinigung durch Hitzedenaturierung zeigte, dass auch das heterolog exprimierte Protein

thermostabil sein musste. Die Messung der Aktivität nach Inkubation der Probe erfolgte bei 50°C.



**Abb. 5.9.**

#### Thermostabilität der ASQR

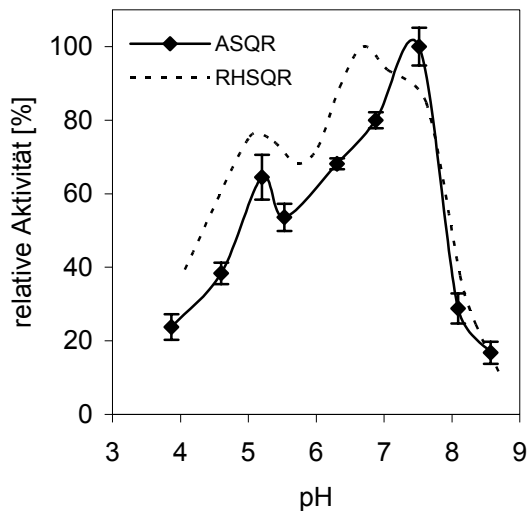
Relative SQR-Aktivität nach Inkubation bei 70°C (**A**), 80°C (**B**) und 90°C (**C**) für den angegebenen Zeitraum. Die Messung erfolgte bei 50°C. Die spezifische Aktivität zum Zeitpunkt 0 min betrug in allen drei Fällen 48 U/mg.

Für jeden Messpunkt wurde ein Mittelwert aus mindestens 3 Messungen errechnet. Die chemische Hintergrundreaktion bei 50°C wurde nicht berücksichtigt (relative Messung).

Nur nach Inkubation bei 90°C war nach 30 Minuten ein Abfallen der Aktivität auf unter 90% des Ausgangswertes nachweisbar. Somit handelt es sich bei der SQR aus *A. aeolicus* um ein sehr gut an seine natürlichen Umgebungsbedingungen angepasstes Protein.

#### 5.4.6. pH-Abhängigkeit der SQR-Aktivität

Für die Messung der pH-Abhängigkeit der Aktivität wurde ein Gemisch aus sechs Puffersubstanzen verwendet, welche mit HCl bzw. NaOH auf die gewünschten Werte im Bereich zwischen 4 und 9 eingestellt wurden (Kap. 8.3.7, S. 69). Die Messungen erfolgten nach Begasung der Pufferlösungen mit Stickstoff bei 25°C.

**Abb. 5.10.****pH-Abhängigkeit der Aktivität der ASQR**

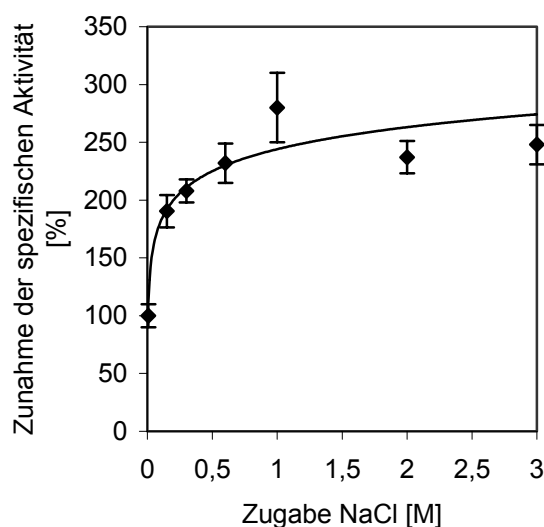
Es wurde die relative Aktivität bezogen auf die maximale Aktivität beim pH-Optimum aufgetragen. Für jeden Messpunkt wurde ein Mittelwert aus mindestens 3 Messungen errechnet. Die Messung erfolgte bei 25°C. Die maximale spezifische Aktivität betrug 4,75 U/mg bei pH = 7,5.

ASQR: *A. aeolicus* SQR-Protein  
 RHSQR: N-terminal modifiziertes  
*R. capsulatus* SQR-Protein  
 (Griesbeck, 2001)

Der Aktivitätsbereich (50% Grenze) erstreckt sich von pH 5 bis pH 7,8 (Abb. 5.10.) und überdeckt somit annähernd drei Zehnerpotenzen an  $H^+$ -Konzentrationen. Der pH-abhängige Aktivitätsverlauf deckt sich hierbei weitgehend mit dem Verlauf der pH-Abhängigkeit für das aus *R. capsulatus* charakterisierte SQR-Protein (Griesbeck, 2001). Die Messung erfolgte bei 25°C, da der pH-Wert des Puffers auch bei dieser Temperatur eingestellt wurde.

**5.4.7. Abhängigkeit der SQR-Aktivität von der Salzkonzentration**

Zur Messung der Abhängigkeit der Aktivität von der NaCl-Konzentration wurden der pH-Wert (6,5) und die Temperatur (25°C) konstant gehalten, und pro Konzentrationsstufe wurden mindestens drei Messungen durchgeführt (Abb. 5.11.).

**Abb. 5.11.****Abhängigkeit der Aktivität der ASQR von der NaCl-Konzentration**

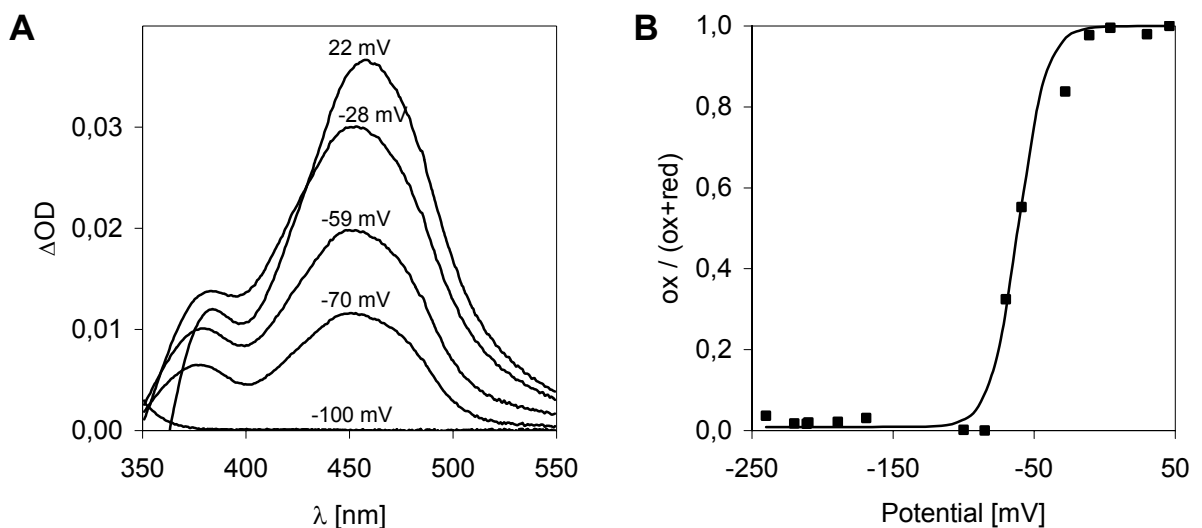
Die Aktivität ohne Zusatz von NaCl zum Reaktionspuffer wurde als 100% (3,6 U/mg) festgesetzt. Für jeden Messpunkt wurde ein Mittelwert aus mindestens 3 Messungen errechnet. Die Messung erfolgte bei 25°C.

Eine Verdopplung der spezifischen Aktivität für Salzkonzentrationen oberhalb von 1 M wurde auch schon von Mederer (2000) für das *R. capsulatus* SQR-Protein beschrieben. In den hier durchgeführten Messungen war die Verdopplung der Aktivität schon bei 0,5 M NaCl erreicht.

#### 5.4.8. Redox Titration des Flavins

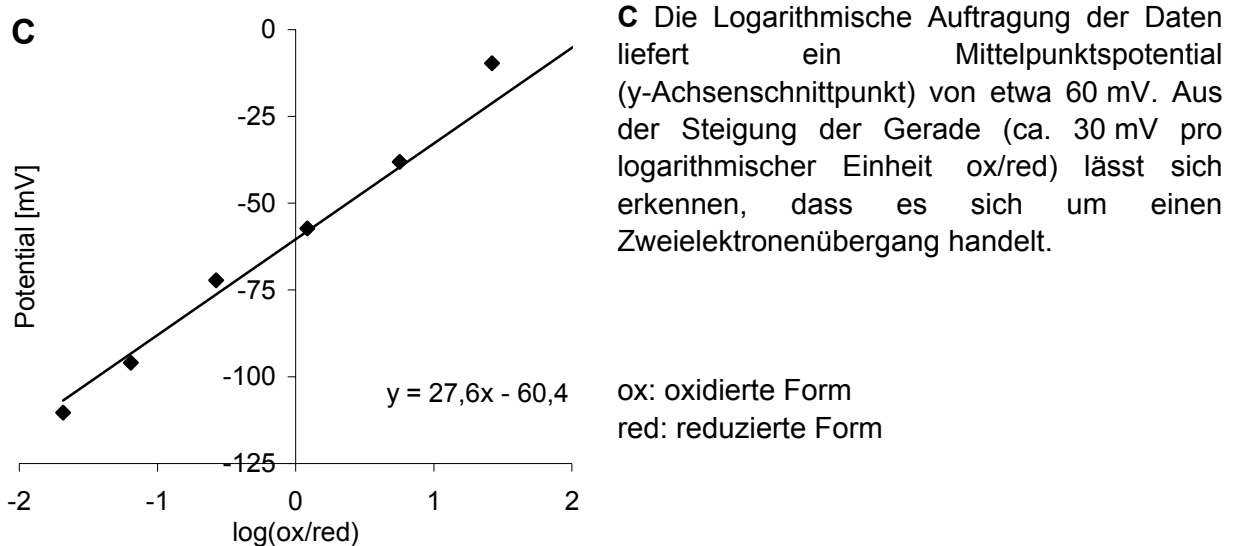
Flavin katalysiert im aktiven Zentrum der SQR-Proteine die sulfidabhängige Reduktion von Chinonen. Sowohl die Oxidationsreaktion von Sulfid zu elementarem Schwefel (-270 mV), als auch die Oxidationsreaktion von Sulfid zu Disulfid (-200 mV) weisen negative Mittelpunktspotentiale auf (Brune, 1989). Die Mittelpunktspotentiale der Reduktion von UQ zu UQH<sub>2</sub> (+120 mV) und von MQ zu MQH<sub>2</sub> (-74 mV) liegen somit um mindestens 120 mV höher. Für das Mittelpunktspotential des FAD-Moleküls in Redoxproteinen liegen die Werte in der Regel bei -60 bis 0 mV (Ghisla & Massey, 1989).

**Abb. 5.12. Redox Titration der ASQR**



**A** Absorptionsspektrum der ASQR während der Reduktion/Oxidation. Dargestellt sind die Differenzspektren der Absorption beim angegebenen Potential nach Abzug des Spektrums niedrigsten Potentials (-240 mV). Die Messung erfolgte bei 25°C und pH 7,0. Die Proteinkonzentration betrug 0,5 mg/ml.

**B** Für die Ermittlung des Anteils der oxidierten Form wurde die Absorptionsänderung bei 450 nm herangezogen. Das Mittelpunktspotential wurde durch zweifache Ableitung der Fitfunktion zu -60 mV bestimmt.



Die Titration wurde bei pH 7,0 durchgeführt, und mit dem Diodenarrayphotometer wurden die Absorptionsänderungen im gesamten messbaren Bereich (198 nm bis 1024 nm) aufgezeichnet. Wie in Kapitel 8.3.8 (S. 70) beschrieben, wurden mehrere Titrations in reduktiver und oxidativer Richtung durchgeführt. Zur Auswertung wurde von allen Spektren das des niedrigsten Potentials abgezogen (Abb. 5.12. A). In einer weiteren Titration ohne SQR-Protein wurde die Absorptionsänderung des Mediatorengemisches im zur Auswertung herangezogenen Bereich von 350 bis 550 nm verfolgt. Der Anteil der Mediatoren an der Absorptionsänderung betrug maximal 5% (vgl. Griesbeck, 2001). In der Auswertung gemäß Nernst ergab sich ein Mittelpunktspotential von -60 mV für das FAD der *A. aeolicus* SQR (Abb. 5.12. B). Dass es sich bei der SQR-Redoxreaktion um einen Zweielektronenübergang handelt kann aus der Steigung der Geraden in der logarithmischen Auftragung (Abb. 5.12. C) entnommen werden. Der Wert für die Steigung der Gerade entspricht mit 27,6 nahezu dem Wert 30 welcher theoretisch für einen Zweielektronenübergang zu erwarten wäre.

Eine zur Kontrolle unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführte Redox Titration des freien FAD-Moleküls ergab für das Mittelpunktspotential einen Wert von -205 mV, welcher gut mit dem aus der Literatur bekannten Wert (-220 mV) übereinstimmt (Thauer et al., 1977).

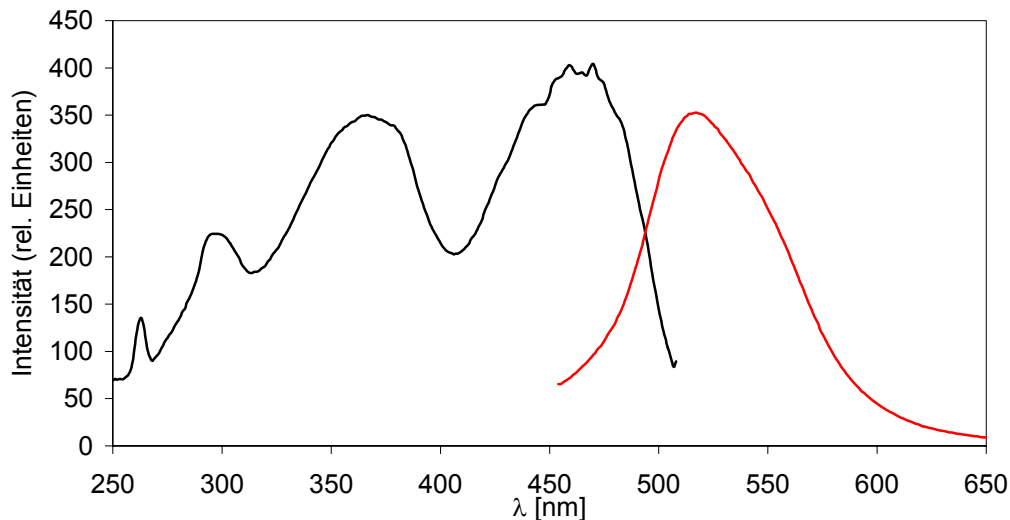
## 5.5. Photochemische Charakterisierung

Flavoproteine der Glutathion-Reduktase Familie binden den Cofaktor FAD entweder kovalent, z.B. über eine Thioetherbindung zwischen einem Cystein und einem Kohlenstoffatom einer Methylgruppe an der 8-Position des Isoalloxazinrings, oder nicht-kovalent über ionische Wechselwirkung und Einbettung in die dreidimensionale Proteinstruktur (Chen et al., 1994, Staal et al., 1969, Karplus & Schulz, 1987). Für die Sulfid-Chinon Reduktasen ist nur der zweite Fall bekannt. Die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften des Proteins sind im sichtbaren Bereich auf die Isoalloxazineinheit des FAD-Moleküls zurückzuführen. Während manche Flavoproteine im reduzierten Zustand fluoreszieren (z.B. D-AOX) zeigen die meisten Fluoreszenzemission im oxidierten Zustand (Munro & Noble, 1999). Für die Sulfid-Chinon Reduktasen ist die Abnahme der Fluoreszenz vom oxidierten Zustand (FAD) zum reduzierten Zustand (FADH<sub>2</sub>) charakteristisch (Schütz, 1997).

Sowohl der FAD- als auch der FMN-Chromophor zeigen von Protein zu Protein unterschiedliche Änderungen spektroskopischer Eigenschaften bei Belichtung. So sind die Bildung von Semichinonen, die Adduktbildung mit Schwefel- und Sauerstoffspezies, sowie dadurch hervorgerufene Verschiebungen der Absorptionsmaxima bekannt. Diese Reaktionen wurden vor allem bei Flavin-Photorezeptoren untersucht und spielen sich in unterschiedlichen Zeitdomänen ab, welche den Bereich von 10<sup>-6</sup> Sekunden (Kottke et al., 2003) bis hin zu mehreren Minuten (Kraft et al., 2003) überstreichen. Dabei entscheiden Proteinumgebung, Lichtqualität und Lichtquantität darüber, welche der Übergangsformen gebildet werden. Aber auch von einigen Vertretern der Glutathion-Reduktase Familie, welche keine Photorezeptoren darstellen, ist eine nicht-lichtinduzierte Bildung von Cystein-Flavin(C4a)-Addukten bekannt (Williams Jr., 1992).

### 5.5.1. Fluoreszenzspektroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Fluoreszenz-Anregungsspektren, als auch Emissionsspektren bei 25°C und pH 6,5 gemäß Kapitel 8.3.9 (S. 71) aufgezeichnet. Das Anregungsspektrum entsprach denen früherer Charakterisierungen der SQR aus *R. capsulatus* (Griesbeck, 1998, Schödl, 2000).



**Abb. 5.13. Fluoreszenzspektrum der ASQR**

Gezeigt ist jeweils das Spektrum der oxidierten ASQR in 50 mM BisTris, pH 6,5

■ Anregungsspektrum der Fluoreszenzemission bei 520 nm

■ Emissionsspektrum bei Anregung mit 450 nm

Die Proteinkonzentration betrug 0,28 mg/ml.

Das Emissionsspektrum bei Anregung mit 450 nm entsprach ebenfalls den früher von Griesbeck (2001) beschriebenen Fluoreszenzspektren der *R. capsulatus* SQR. Analog zu den Experimenten mit der *R. capsulatus* SQR (Schödl, 2000, Griesbeck, 2001) nahm die Intensität der Flavinforeszenz bei Zugabe von mikromolaren Konzentrationen an Sulfid ab und konnte durch die Zugabe von Chinon wieder erhöht werden (Daten nicht gezeigt).

### 5.5.2. Bleichung im Starklicht

Die vom SQR-Protein katalysierte Reaktion ist lichtunabhängig. Im von Griesbeck et al. (2002) vorgeschlagenen Mechanismus wird die Bildung eines Cystein-Flavin(C4a)-Adduktes postuliert, welches unter Umständen auch durch intensive Belichtung in Abwesenheit von Sulfid erzeugt werden könnte. Eine damit einhergehende Veränderung im Absorptions- und Fluoreszenzverhalten könnte die Richtigkeit des vorgeschlagenen reduktiven Teil-Mechanismus bekräftigen.

Die Messungen wurden bei 25°C und pH 6,5 im Fluoreszenzspektrometer (Shimadzu RF-5301) durchgeführt. Sowohl eine konstant hohe Beleuchtung über mehrere Minuten mittels einer Lichtquelle (Flexilux 600, Schölly, Denzlingen, Deutschland), als auch eine Blitz-Belichtung mit einem Fotoblitz (Cullman DC36, Langenzenn, Deutschland) führten zu keiner Veränderung im Fluoreszenzspektrum. Sichere Rückschlüsse auf den Mechanismus lassen sich aus diesen Messungen aber nicht ziehen, da die Zeitauflösung der Messungen im Bereich weniger Sekunden lag.

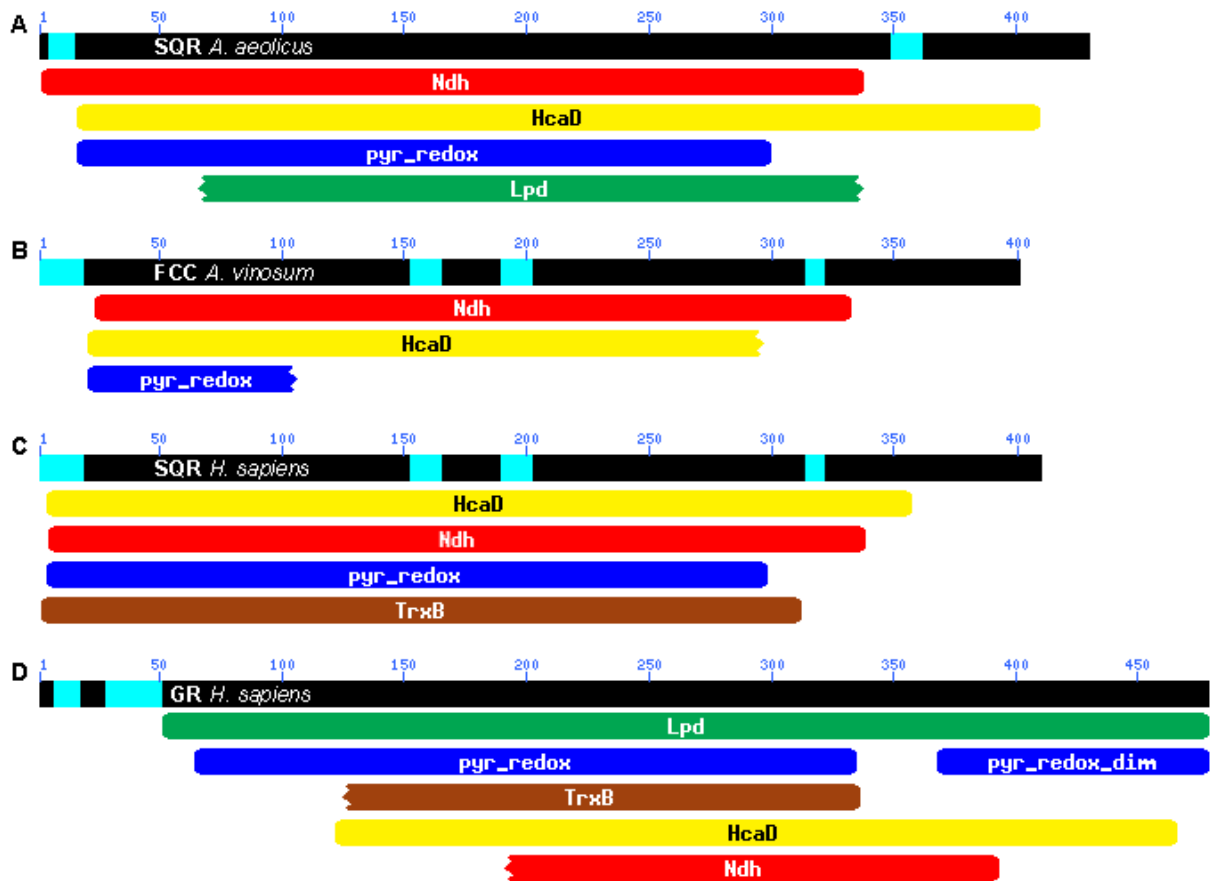


## 5.6. Sequenzvergleiche

Durch Vergleiche der Primärsequenz bekannter SQR-Proteine wurden charakteristische Peptidsequenzen gefunden (Griesbeck et al., 2000). Ferner konnte durch Austausch einzelnen Aminosäuren eine funktionelle Rolle zugewiesen werden (Griesbeck et al., 2002). Üblicherweise bilden Proteindomänen strukturell konservierte Untereinheiten („building blocks“) der dreidimensionalen Struktur eines Proteins. Marchler-Bauer et al. (2003) zeigten, dass zwei Drittel aller bekannter Proteinsequenzen, mit Hilfe einiger tausend Domänen, strukturell beschrieben werden können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden SQR-Proteine und SQR-homologe Proteine mit dem frei verfügbaren Programm CDD (Conserved Domain Database, NCBI, <http://www.ncbi.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) auf das Vorhandensein bekannter Proteindomänen-Strukturen analysiert. Als Vertreter der SQR-Proteine wurde das *A. aeolicus* SQR-Protein gewählt, als Vertreter der SQR-homologen Proteine wurde das aus *H. sapiens* bekannte SQR-ähnliche Protein verwendet. In beiden Fällen ist deren dreidimensionale Struktur noch nicht bekannt. Mit Hilfe des CDD-Programms, welches zum Zeitpunkt des Entstehens dieser Arbeit etwa 5000 Strukturen enthielt, sollten Ähnlichkeiten zu bekannten Proteindomänen gefunden werden, welche in den strukturell aufgeklärten Proteinen FCC (*A. vinosum*) und GR (*H. sapiens*) vorkommen.

Wie in Abbildung 5.14. (S. 34) zu erkennen ist, wurde in allen vier untersuchten Proteinen eine gemeinsame Ähnlichkeit zu den als Ndh und HcaD bezeichneten Domänen gefunden. Bei dem Ndh-Motiv handelt es sich um eine FAD-bindende Untereinheit wie sie aus Typ-II-NADH-Dehydrogenasen (Yagi et al., 2001) bekannt ist. Das HcaD-Motiv ist aus 171 Proteinen bekannt, welche NAD/FAD-abhängige Dehydrogenasen darstellen. Ebenso, wenn auch für das FCC nur teilweise, wurde vom CDD-Programm in allen vier Sequenzen eine Ähnlichkeit zum pyr\_redox Motiv festgestellt. Auf das pyr\_redox\_dim Motiv, welches nur in der GR-Sequenz gefunden wurde, wird im Kapitel 5.6.2 (S. 38) näher eingegangen. Das untersuchte GR-Protein aus *H. sapiens* zeigte ferner eine Verwandtschaft zum *A. aeolicus* SQR-Protein, da in beiden eine Lpd-Domäne erkannt wurde wie sie aus unterschiedlichen Lipoamid-Dehydrogenasen bekannt ist. Auch das SQR-homologe Protein aus Mensch zeigt eine Verwandtschaft zur untersuchten GR-Sequenz, da beide ein Thioredoxin-Reduktase (Trx) Motiv enthalten.

Die mit dem CDD-Programm gefundenen Ähnlichkeiten zu bekannten Sequenzmotiven weisen auf eine hohe strukturelle Verwandtschaft der untersuchten Proteinfamilien von SQR, FCC und GR hin, auf welche in den beiden folgenden Kapitel näher eingegangen werden soll.



**Abb. 5.14. Ähnlichkeiten zu konservierten Domänen der CDD-Datenbank**

Zur Untersuchung wurden jeweils die Aminosäuresequenzen der Proteine dem CDD-Programm übergeben.

**A** Suche mit dem *A. aeolicus* SQR-Protein (Acc. No. NP\_214500)

**B** Suche mit dem N-terminal um die Präsequenz von 30 Aminosäuren verkürzten *A. vinosum* FCC-Protein (Acc. No. AAB86576)

**C** Suche mit dem N-terminal um die Präsequenz von 41 Aminosäuren verkürzten *H. sapiens* SQR-Protein (Acc. No. NP\_067022)

**D** Suche mit dem N-terminal um die Präsequenz von 43 Aminosäuren verkürzten *H. sapiens* GR-Protein (Acc. No. P00390)

CDD-Name	CDD-Bezeichnung
<b>Ndh</b>	NADH-Dehydrogenase-Domäne, FAD-beinhaltende Untereinheit
<b>HcaD</b>	Uncharakterisierte NAD(FAD)-abhängige Dehydrogenase-Domäne
<b>pyr_redox</b>	Pyridin Nukleotid-Disulfid Oxidoreduktase Domäne Diese Domäne beinhaltet eine NADH-Bindedomäne innerhalb einer FAD-Bindedomäne
<b>pyr_redox_dim</b>	Dimerisierungsdomäne der Pyridin Nukleotid-Disulfid Oxidoreduktasen
<b>Lpd</b>	Pyruvat/2-Oxoglutarat Dehydrogenase Komplex, Lipoamid-Dehydrogenase Komponente und verwandte Enzyme
<b>TrxB</b>	Thioredoxin-Reduktase
	im Alignment unberücksichtigte Bereiche der untersuchten Sequenz (geringe Homologie)

### 5.6.1. Homologien innerhalb der GR-Familie

Innerhalb der FAD-bindenden Proteine bildet die Familie der Glutathion-Reduktase ähnlichen Proteine gemäß der von Dym und Eisenberg (2001) vorgeschlagenen Klassifizierung eine Untergruppe mit starker Konservierung der dreidimensionalen Struktur. Unter Verwendung des CE-Programms (Shindyalov & Bourne, 1998) konnte dort die GR-Familie bezüglich Ihrer Faltungsmuster in zwei Unterklassen (GR<sub>1</sub> und GR<sub>2</sub>) weiter unterteilt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun eine Klassifizierung der SQR anhand der von Dym und Eisenberg (2001) vorgeschlagenen Sequenzmotive vorgenommen werden:

**Tabelle 5.1. Sequenzmotive innerhalb der GR<sub>1</sub>-Familie (Dym & Eisenberg, 2001)**

GR Glutathion-Reduktase (Karplus & Schulz, 1987)

LipDH Lipoamid-Dehydrogenase (Mande et al., 1996)

FCC in Dym & Eisenberg (2001) als Sulfide-Dehydrogenase bezeichnet (Chen et al., 1994)

h Position mit hydrophober Aminosäure

x Position mit beliebiger Aminosäure

Nr.	Sequenzmotiv	Beispiele	diese Arbeit
1	GxGxxGx <sub>17-19</sub> E GxGxxG	GR, FCC, LipDH	SQR nur <i>H. sapiens</i> SQR
2	Dx <sub>6</sub> GxxP Dx <sub>6</sub> PxxA Dx <sub>6</sub> GxxL	GR, LipDH FCC	SQR
3	hhhxGxGxxAxE hhhxGxGxxGxE hhh x <sub>14</sub> E hhh x <sub>11</sub> AxE	GR LipDH FCC	SQR
4	Dx <sub>6</sub> GxxP Dx <sub>5</sub> PPxxA Dx <sub>5</sub> P	GR, LipDH FCC	SQR nur <i>S. solfataricus</i>
5	Tx <sub>5</sub> TxxGD Tx <sub>5</sub> FxxGD Sx <sub>6</sub> HxxGD Tx <sub>4</sub> FxxGV	GR LipDH FCC	SQR
6	KLVx <sub>9</sub> G	GR, LipDH	siehe Kapitel 5.6.2, S. 38 nicht in Abb. 5.15.

Das Alignment (Abb. 5.15.) ausgewählter SQR-Proteine und SQR-homologer Proteine wurde mit dem T-COFFEE Programm (Notredame et al., 2000) durchgeführt. Im Vergleich zu anderen Programmen liefert der T-COFFEE Algorithmus vor allem beim Alignment wenig homologer Sequenzen bessere Ergebnisse. Um eine Einordnung der untersuchten Proteine in die GR<sub>1</sub>-Familie, zu der auch FCC gehört, zu begründen wurde versucht die von Dym und Eisenberg (2001) vorgeschlagenen Elemente in den SQR-Sequenzen zu finden.

```

CG 2000          -----I-----
Dym              G G G   h h             h hE
PROF sec         EEEEE   HHHHHHHHHHH   EEEEE   HHHH
pdb             EEEEEEE   HHHHHHHHHHH H   EEEEE   EEE   HHH
FCC A.v.        AGRKVVVVGGGTGGATAAKYIKL-ADP-----SIEVTLIEPNTDYTYCYLSNEV   48
SQR A.a.        MAKHVVVVIGGGVGGIATAYNLRN-LMP-----DLKITLISDRPYFGFTPAFPHL   48
SQR R.c.        -MAHIVVLGAGLGGAIMAYELREQVRK-----EDKVTVITKDPMYHFVPSNPWV   48
SQR S.s.        MAKRVIIAGGNIAGTIVANRLVQKLEHEVNKGDVEIVALNKSDEHIYLPQQLLV   54
SQR H.s.        NHYEVLVLGGSGGITMAARMKRKVG-----AENVAIVEPSERFHYQPIWTLV   48
Consensus       .::: * . . *   *   :           : : .   .   :
    
```

```

CG 2000          -----
Dym
PROF sec         H   HHHHH   HHHHHH   EEE   EEEEEEEEE   EEEEE   EEEEE
pdb             HH   EEE   HHHH   EEE   EEE   EEEEE   EEEEE
FCC A.v.        IGGDRKLESIKHGYDGLRAH-GIQVV---HDSATGIDPDKKLVKTAGGAEFQY   97
SQR A.a.        AMGWRKFEDISVPLAPLLPKFNIEFI---NEKAESIDPDANTVTTQSGKKIEY   98
SQR R.c.        AVGWRDRKEITVDLAPTMARKNIDFI---PVAAKRLHPAENRVELENGQSVSY   98
SQR S.s.        GFGLTPGELVVRKESELLDP-RIKFLHGQKGTISKIDVANHSVQTADGVSHSY   106
SQR H.s.        GAGAKQLSSSGRPTASVIPS-GVEWI---KARVTELNPKNCIHTDDDEKISY   97
Consensus       * . .   .   : :   : :   : :   . . . *
    
```

```

CG 2000          -II-----          -----1--C-----
Dym              D   G   L
PROF sec         EEEEE   EEEEE   HHHHHHHHHHH   E
pdb             EEEEE EEEEE   H   HHHHHHHHHHH
FCC A.v.        DRCVVAPGIELIYDKIEGY-SEEAAAKLPHAWKAGEQTAILRKQLEDMADGGT   149
SQR A.a.        DYLVIIATGPKLVFG---AEGQEENST-----SICTAEHALETQKKLQELYAN-P   143
SQR R.c.        DQIVIIATGPELAFDEIEGFGPEGHTQ----SICHIDHAEAAGAAFDRFCEN-P   146
SQR S.s.        DYLVITTGVDYTWDEIPGY-RSAA-H----TVYEYDDAIKMRREALKFDGG-T   152
SQR H.s.        RYLIIALGIQLDYEKIKGL-PEGFAHPKIGSNYSVKTVKTKWALQDFKEG-N   148
Consensus       : : : * .   :   .   .   :   . .   : : : .
    
```

```

CG 2000          -----2---C-----          -----3-----
Dym              VVV   I G   G A E
PROF sec         EEEE   HHHHHHHHHHHHHHHH   EEEEE
pdb             EEEE   HHHHHHHHHHHHHHHH   EEEEE
FCC A.v.        --VVIAPPAAPFRCPPGPYERASQVAYYLKAH--KPKSKVIILDSSQ-----TFSK   196
SQR A.a.        GPVVIGAIPG-VSCFGPAYEFALMLHYELKKRGIRYKVPMTFITSEPYLGHFGVGG   198
SQR R.c.        GPIIIIGAAQG-ASCFCGPAYEFTFILDALRKRKIRDKVPMTFVTSEPYVGHGLDGD   201
SQR S.s.        IVVNTAKL-P-HRCVPAPLEVTLILDDYLKRKRGIRDKTKIIYTYPVQ-----GVFG   201
SQR H.s.        AIFTFPNT-P-VKAGAPQKIMYLSEAYFRKTKGRSKANIIFNLSLG-----AIFG   197
Consensus       .   .   *   .   :   :   :   *   :   .   .
    
```

```

CG 2000
Dym
PROF sec         HHHHHHHHHHHHHH   EEEEE   EEEEE   EEEEE
pdb             HHHHHHHHHHHH   EEEEE   E   EE   EEEE
FCC A.v.        QSQFSKQWERLYGFGTENAMIEWHPGDSAVVKV--DGGEMMVET--AFGD----   243
SQR A.a.        IGASKRLVEDLF----AERNIDWI--ANVAVKAI--EPDKVIYED--LNGN----   239
SQR R.s.        VGDTKGLLEGNL----RDKHIKWM--TSTRIKRV--EPGKMVVEE--VTEDGTVK   246
SQR S.s.        RPITNKFMLRLF----EQRGIEVH--SPFTVTSV--DPNNKVIES--QEGE----   242
SQR H.s.        VKKYADALQEII----QERNLTVN--YKKNLIEVRADKQEAUVFENLDKPGE----   242
Consensus       :   :   :   :   :   :   :   *   :
    
```

CG 2000					-----III--	
Dym		D	P	A		T F
PROF sec	EEEEEEEEEE			HHHHH	EEEE	EEEE
pdb	EEE EEEEE	EEEE	HHHH		EEE	EEEE EEEEE
FCC A.v.	---EFKADV	INLIPPQ	RAGKIAQI	--AGLTND	AGWCPVD	IKTFESSIHKGIHVI 292
SQR A.a.	-THEVPAK	FTMFMP	SFQGP	EVVASAG	DKVANP	ANKMVI
SQR R.c.	PEKELP	FGYAM	MLPAF	RGIKAL	MGI-EGL	VNPRGF
SQR S.s.	-K--LKF	DMLIG	IPNMG	AKVIED	--SGI	DRRRV
SQR H.s.	-TQVIS	YEMLH	VT	PPMS	PPDVL	KT--SP
Consensus	.	*	.	.	:	:
CG 2000	-----				-III- ----4----	
Dym	GV					
PROF sec	E				HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	
pdb					HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	
FCC A.v.	GDACIANP	-----	MPKSG	YSANS	QKVA	AAAVV
SQR A.a.	GVVT-AI	PIEKT	PIPTG	VPKTG	MMIEQ	MAMAV
SQR R.c.	GVCV-AI	PPVG	PTV	PCG	VPKTG	FMI
SQR S.s.	GDAT-D	L	P	-----	VSKAG	STAD
SQR H.s.	GDCT-N	L	P	-----	TSKTA	AAVAA
Consensus	*	*	.	.*:.	:	: :
CG 2000		--C--5----				-----6---
Dym						
PROF sec		EEEEEEEE		EEEE		EEEE EE
pdb		EEEEEEEE		EEEE		EEEE EE
FCC A.v.	-----	PSYLN	TCYSI	LAPAY	GISVA	-----AI
SQR A.a.	----	APRL	SAIC	IADFG	EDAG	FFFAD
SQR R.c.	----	VGSW	NAV	CLAD	FGDK	GIAF
SQR S.s.		LCYI	ATG	TQAT	YIRF	SYTM
SQR H.s.		SCPL	VTG	YNR	VILAE	FDYK
Consensus		:	.	.	:	:
CG 2000	-----					
Dym						
PROF sec	E				HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	
pdb	EE E	EEE			HHHHHHHHHHHHHHHHHHH H	
FCC A.v.	ES---	VPD	SGG	VTP	VDAP	DWVL
SQR A.a.	LW---	KVR	NG	NIAP	-SFEE	KVLEI
SQR R.c.	MH---	KL	RR	GT	SET-	FYEK
SQR S.s.	MYW	TVT	A	KAV	V-----	
SQR H.s.	LYW	NM	L	R	G	Y
Consensus						

### Abb. 5.15. Sequenzalignment von ASQR und Homologen

Das Alignment der Sequenzen von FCC A.v. (*Allochrochromatium vinosum*, Acc. No. AAB86576, N-terminal um die Präsequenz von 30 Aminosäuren verkürzt), SQR A.a. (*A. aeolicus*, Acc. No. NP\_214500), SQR R.c. (*R. capsulatus*, Acc. No. CAA66112), SQR S.s. (*Sulfolobus solfataricus*, Acc. No. NP\_343961) und SQR H.s. (*Homo sapiens*, Acc. No. NP\_067022, N-terminal um 41 Aminosäuren verkürzt) wurde mit T-COFFEE (Notredame et al., 2000) erstellt. Identische Aminosäuren sind mit \* gekennzeichnet, Doppelpunkt und Punkt zeigen hohe bzw. geringe Ähnlichkeit an.

Die oberste Zeile cg 2000 enthält die Annotation der SQR-typischen Bereiche nach Griesbeck et al. (2000). Römische Ziffern kennzeichnen FAD-bindende Domänen, arabische Ziffern kennzeichnen SQR-typische Bereiche (ebd.). Darunter (Dym) sind die nach Dym und Eisenberg (2001) gefundenen Sequenzmotive 1 bis 5 (Tab. 5.1) der GR<sub>1</sub>-Familie dargestellt. Die dritte Zeile PROF sec stellt die mit PROF (<http://www.aber.ac.uk/~phiwww/prof/>) vorhergesagten Sekundärstrukturmotive für SQR A.a. dar, die vierte Zeile pdb zeigt die aus der Kristallstruktur bekannten Sekundärstrukturmotive für FCC aus *A. vinosum* (PDB ID: 1FCD, H: Helix; E: Faltblatt).

Das Sequenzmotiv Nr. 1 aus Tabelle 5.1. findet sich wie für die meisten GR<sub>1</sub>- und GR<sub>2</sub>-Vertreter beschrieben auch in der SQR-Sequenz (Abb. 5.15, S. 36). Strukturell handelt es sich dabei um ein Motiv aus zwei  $\beta$ -Faltblättern, welche durch eine  $\alpha$ -Helix unterbrochen werden. Dieser Bereich wurde von Griesbeck et al. (2000) als FAD-bindende Domäne I bezeichnet. Auch der Bereich des Motivs Nr. 2 (Tab. 5.1.) entspricht einem von Griesbeck et al. (2000) als FAD-bindende Domäne II bezeichneten Abschnitt. Das Motiv Nr. 3 enthält das erste der beiden Cysteine, welche für die phylogenetischen Untersuchungen von Theissen et al. (2003) herangezogen wurde. Dieser Abschnitt wurde von Griesbeck et al. (2000) als SQR-typischer Bereich 2 bezeichnet und ist in allen GR<sub>1</sub>-Vertretern zu finden. In Abb. 5.15. (S. 37) ist der Bereich des Motivs Nr. 4 nur schwach konserviert. Von Griesbeck et al. (2000) wurde er weder als FAD-bindende Domäne noch als SQR-typischer Bereich erkannt und er ist nur in der *S. solfataricus* SQR-Sequenz teilweise erkennbar. Schon von den Vertretern der Glutathion-Reduktase Familie sind im Bereich des Motivs Nr. 5 einige Modifikationen bekannt. Allen gemeinsam ist lediglich das Glycin an der vorletzten Position des Motivs. Ausgehend von dieser Position kann das gesamte Motiv Tx<sub>4</sub>FxxGV aber in *R. capsulatus* und *A. aeolicus* SQR gefunden werden. Das letzte Motiv (Nr. 6) wurde zwar von Dym und Eisenberg (2001) als Gemeinsamkeit der GR<sub>1</sub>-Familie erkannt, jedoch nicht als Bereich der Dimerisierung näher beschrieben. Im nächsten Kapitel soll deshalb näher auf diesen Bereich und dieses Sequenzmotiv eingegangen werden.

Die hier gefundenen homologen Sequenzmotive sowie die von Griesbeck (2001) auf Basis von Circular-Dichroismus-Messungen gefundenen Daten berechtigen somit eine Einordnung der SQR-Proteine in die Untergruppe GR<sub>1</sub> der Glutathion-Reduktase Familie (Dym & Eisenberg, 2001).

### 5.6.2. Dimere Organisation der GR-Familie

Die Ähnlichkeiten der SQR-Proteine und deren Homologer zu Vertretern der Glutathion-Reduktase Familie sowie Experimente mit Molekularsiebsäule, Ultrafiltration und Nativgel legen den Schluß nahe, dass es sich bei der SQR um ein nicht-kovalent verknüpftes Homodimer handelt (Schütz, 1997, Schödl, 2000). Für die Dimerisierung der Pyridin-Nukleotid-Disulfid Oxidoreduktasen konnte eine konservierte Domäne ausgemacht werden. Sowohl in den Untersuchungen von Dym und Eisenberg (2001) (vgl. hierzu Tab. 5.1., Motiv Nr. 6, S. 35) als auch in Untersuchungen von Vertretern der Glutathion-Reduktase Familie im Rahmen dieser Arbeit mit dem CDD-Programm (Marchler-Bauer et al., 2003) wurde eine als pyr\_redox\_dim bezeichnete homologe Domänenstruktur gefunden (vgl. Abb. 5.14 D, S. 34). Die CDD-Suche mit den gleichen Parametern unter Verwendung der Sequenz des FCC von *A. vinosum* liefert dahingegen keinen Treffer für ein pyr\_redox\_dim Motiv (Abb. 5.14 B).

Unter Zuhilfenahme der bekannten Tertiärstrukturen von FCC, GR und LipDH, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht die Sequenzmotive im Dimerisierungsbereich der jeweiligen Proteinuntereinheiten vergleichend darzustellen.

Dym	KLK	G	
pfam	-----ANGRALAYGETKGFVKLVADAET-----	-----GRILGAHIVGPNAGELIQEAALAIKM-----	
LipDH	-----ASGRAMAANDTAGFVKVIADAKT-----	-----DRVLGVHVIGPSAAELVQGGALAMEE-----	GTS AEDLGM 445
GR	-----AMYTAVTTHRQPCRMLVCV GSE-----	-----EKIVGIHGIGFGMDEMLQCFVALKM-----	GATKKDFDN 434
FCC	CPGPGYERASQVAYYLKAHKPKSKVTILDSSQTFSKQSQFSKGWERLV	SFG-----FENAM-----	IEWHPGP 223
A. a.	CFGPAYEFALMLHYELKRRGIRYKV-----PMTFFITSEPY-LGHFVG	GIG-----ASKRLVEDLFAERNIDWIA	219
R. c.	CFGPAYEFTFILDALRKRKIRDKV-----PMTFVTSEPY-VGHLGLD-----	GVG-----DTKGLLEGNLRDKHIKWM	222
Cons4	* * * * * : : * : :	* : * : *	:
Cons3	* ** : : * : : ** . ** . . . : * :	* * : * * :	: : * * .
Cons6	:	* :	:

**Abb. 5.16. Sequenzalignment der Dimerisierungsdomänen**

Die Farben der hinterlegten Bereiche entsprechen den Sekundärstrukturanteilen gleicher Farbe in Abb. 5.18. Sie sind kein Maß für die Homologie!

Die oberste Zeile *dym* enthält das aus Dym und Eisenberg (2001) bekannte Motiv Nr. 6 (Tab. 5.1.), welches sowohl in der Glutathion-Reduktase als auch in Lipoamid-Dehydrogenase vorkommt. *pfam* stellt die Aminosäuresequenz der Dimerisations-Domäne der Pyridin Nukleotid-Disulfid Oxidoreduktasen dar (CDD-Bezeichnung *pyr\_redox\_dim* vgl. Abb. 5.14.). Darunter sind die Sequenzbereiche aus Lipoamid-Dehydrogenase *Azotobacter vinelandii* *LipDH* (Mattevi et al., 1991, NCBI GI 494878), Glutathion-Reduktase *E. coli* *GR* (NCBI GI 809422) und FCC *A. vinosum* *fcc* (Chen et al., 1994, Acc. No. AAB86576) dargestellt.

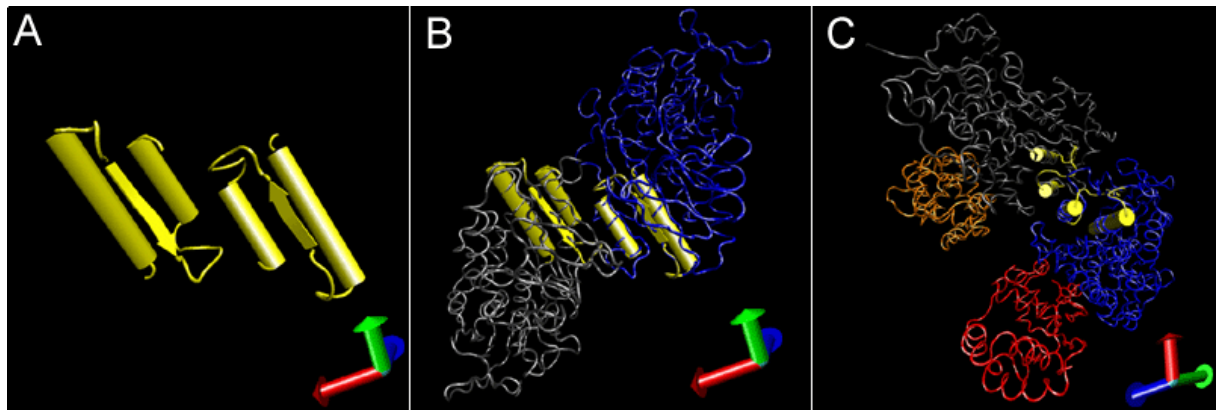
*A. a.* bzw. *R. c.* zeigen den Flavocytochrom *c* entsprechenden Bereich der SQR aus *A. aeolicus* (Acc. No. NP\_214500) bzw. *R. capsulatus* (Acc. No. CAA66112) aus Abb. 5.15.

*cons4* zeigt die Homologien von *pfam*, *LipDH*, *GR* und *FCC* (mit | gekennzeichnet).

*cons3* zeigt die Homologien von *FCC*, *A. a.* und *R. c.* (mit █ gekennzeichnet).

*cons6* zeigt die Homologien aller sechs verglichener Sequenzen. Identische Aminosäuren sind mit \* gekennzeichnet, Doppelpunkt und Punkt zeigen hohe bzw. geringe Ähnlichkeit an.

Da der Dimerisierungsbereich des FCC aus der Kristallstruktur bekannt war, konnte ein Sequenzalignment dieses Bereichs mit dem Dimerisierungsbereich von GR und LipDH erstellt werden (Zeile *cons4* in Abb. 5.16.). Der Vergleich der Primärstruktur zeigt für GR und LipDH keine großen Homologien zu FCC, die SQR-Sequenzen von *A. aeolicus* und *R. capsulatus* hingegen zeigen hohe Ähnlichkeit zu der FCC-Sequenz (Zeile *cons3* in Abb. 5.16.). Strukturell handelt es sich beim Dimerisierungsbereich der Flavoproteinuntereinheiten des FCC-Proteins um ein  $\alpha\beta\alpha$ -Motiv (Abb. 5.17.).



**Abb. 5.17. Dimerisierungsbereich des FCC**

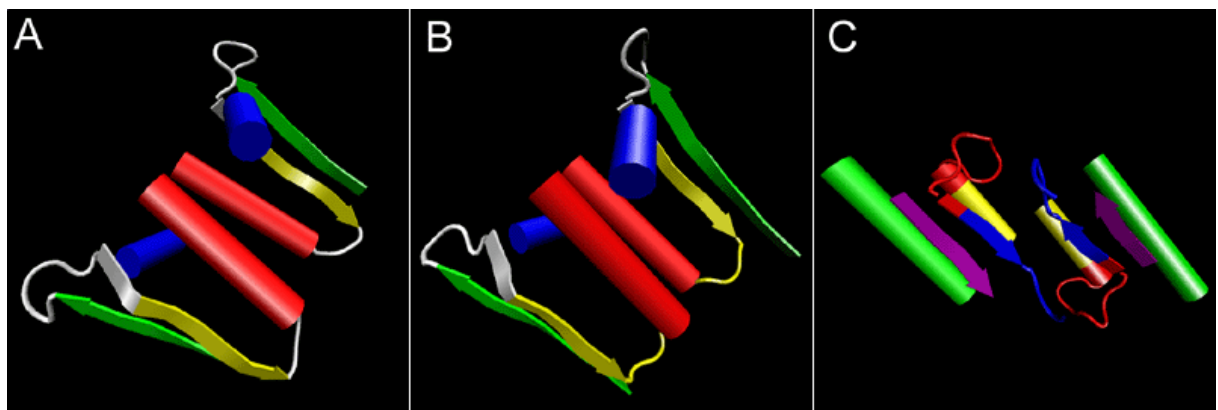
Allen Strukturen liegt die von Chen et al. (1994) ermittelte Struktur zugrunde (PDB ID:1FCD).

**A**  $\alpha\beta\alpha$  Strukturbereich der beiden Flavoproteinuntereinheiten des FCC

**B**  $\alpha\beta\alpha$  Strukturbereich und Proteinrückgrad der beiden Flavoproteinuntereinheiten des FCC

**C**  $\alpha\beta\alpha$  Strukturbereich innerhalb der FCC Gesamtstruktur nach Drehung von Abb. B um zwei Raumrichtungen (vgl. farbiger Achsenursprung rechts unten)

Die nähere Betrachtung der Sekundärstrukturelemente der Dimerisierungsdomänen (Abb. 5.18.) zeigt klar auf, dass sich das nahezu identische Dimerisierungsmotiv von LipDH und GR stark vom Dimerisierungsbereich des FCC unterscheidet. In Abb. 5.18 wurde das  $\alpha\beta\alpha$ -Motiv aus Abb. 5.17. am carboxyterminalen Ende um ein  $\beta$ -Faltblatt erweitert dargestellt, damit der farblich markierte Bereich des FCC aus Abb. 5.16. gezeigt werden kann.



**Abb. 5.18. Dimerisierungsbereich von LipDH, GR und FCC**

Die Farben der Sekundärstrukturanteile entsprechen den mit gleicher Farbe hinterlegten Bereichen in den Peptidsequenzen der Abb. 5.16..

**A**  $\beta\beta\alpha\alpha$  Strukturbereich der beiden Untereinheiten der LipDH (PDB ID: 3LAD).

**B**  $\beta\beta\alpha\alpha$  Strukturbereich der beiden Untereinheiten der GR (PDB ID: 1GET).

**B**  $\alpha\beta\alpha\beta$  Strukturbereich der beiden Flavoproteinuntereinheiten des FCC (PDB ID: 1FCD).

Die Vorhersage der Sekundärstruktur motive für die SQR aus *A. aeolicus* (Abb. 5.15., Zeile PROF sec, S. 36) liefert für den Bereich der Aminosäuren Nummer 158 bis 218 ein dem



FCC entsprechendes  $\alpha\beta\alpha\beta$ -Muster. Der erste  $\alpha$ -helikale Bereich dieser Domäne wurde von Griesbeck et al. (2000) als SQR-typischer Bereich 3 bezeichnet.

Diese Untersuchungen zeigen einen deutlichen Unterschied des Dimerisierungsbereiches von FCC und anderen Vertretern der Glutathion-Reduktase Familie auf. Da die SQR-Proteine und deren Homologe in diesem Bereich stark konserviert sind und starke Ähnlichkeiten zu FCC aufweisen (Abb. 5.16., S. 39), ist anzunehmen, dass ihr Dimerisierungsbereich eher dem des FCC entspricht.

### 5.6.3. Thermostabile Sulfid-Chinon Reduktasen

Obwohl kein monophyletischer Ursprung der Thermophilie angenommen werden kann, wäre zu erwarten, dass in homologen Proteinen, welche sich aus ihren jeweiligen mesophilen Vorgängern entwickelt haben, die Stabilisierung identischer Domänen durch ähnliche Veränderungen bedingt wird. So wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende thermophile SQR-Homologe mit dem biochemisch gut charakterisierten SQR-Protein aus *R. capsulatus* verglichen: SQR aus *A. aeolicus* mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 85°C, SQR aus *Thermosynechococcus elongatus* (55°C, Kaneko et al., 2002), SQR aus *Sulfolobus solfataricus* (87°C, Cacciapuoti et al., 1986) und SQR aus *Bacillus stearothermophilus* (65°C, Nazina et al., 2001).

	+	*		-	*		-	*	**	-	+				
SQR_R.c.	MA	----	HIVVLGAGLGGAIMAYELREQVR	----	KED	-	KVTVITKDP	MPYHFVPSNPVWAV				50			
SQR_A.a.	MAK	----	HVVVIGGGVGGIATAYNLRNLM	----	PDL	-	KITLISDRPYFGFTPAFPHLAM					50			
SQR_T.e.	MA	----	RVVVLGAGIGGLPTAYELKHLRG	----	DRH	-	EVILVSDVDRFTFIPGLVAVAL					50			
SQR_S.s.	MAK	----	RVIIAGGNIAGTIVANRLVQKLEHEVNKGDVEIVALNKSDEHIYLPGQLLVGF									56			
SQR_B.s.	MARVYD	GKVVIVGAGSAGISIAARLLRKNRQLYG	----	QVLLID	PSDKHYYQPLWTLVGG							56			
Cons			::::	*	.	*	.	*	.	::	:	.	:	*	::
TCons			::::	*	.	*	.	.	.	::	::	.	:	*	::
			*-*		*		++	*	+-	-	-	++	+	*	
SQR_R.c.	GWRDRKEITVDLAPT	MARKNIDFI	----	PVAAKRLHPAENRVELENGQSVSYDQIV	VIATGP										107
SQR_A.a.	GWRKFEDISVPLAPLLPKFNIEFI	----	NEKAESIDPDANTVTTQSGKKIEYDYLVIATGP												107
SQR_T.e.	GHNSLERLQVPLETVSRRHGLRWV	----	QGVQRLAPQEKKIYLPE-QALDYDYLVIATGA												106
SQR_S.s.	GLETPGELVRKESELL-DPRIKFLHGQKGTISKIDVANHSVQTADGVSHSYDYLVIITGV														115
SQR_B.s.	GAAKAEDSVREQASL-IPEGAKWL	----	KEAVDTFMPEHNTLKTREGSEVRYDYLVAAGI												112
Cons	*			::	.	:	:	:	.	**	:	*	:	*	*
TCons	*	.	:	.	:	:	:	:	.	*****	:	*	:	*	*
	*	--	+	+	*	-	++	-	*	-					*
SQR_R.c.	ELAFDEIEGFGPEGH	TQSICHIDHAEAAAGAA	FRFCENPGPIIIGAAQ	--	GASCFGPAYE										165
SQR_A.a.	KLVFGA-EGQE	--ENSTSICTAEHALETQKKLQEL	YANPGPVVIGAIP	--	GVSCFGPAYE										162
SQR_T.e.	ELAVDLIPGLG	--IHSHSVCTPAHAVAAQRAWQEF	LKEPRDLVVGAAAP	--	GASCFGPAYE										162
SQR_S.s.	DYTWEIPGYR	--SAAHTVYEYDDAIKMR	EALKEF	--	DGGTIVVNTAK-LPHRC	PVAPLE									170
SQR_B.s.	EIYWDQIKGLKETIGKNGVCSNYSYDYVQSTWENIRNFRGGT	AI	FTQPSTPVKCGGAPQK												172
Cons	.	.	*	:	:	:	:	:	.	*	:	.	:	.	.
TCons	.	.	*	:	:	:	:	:	.	*	:	.	:	.	.

	* + ***- *-*	* * - - *+ *+ -** - *	-	
SQR_R.c.	FTFILD TALRKRKIRDKVPMFTFVTSEPYVGHLLGLDGVGDTKGLLEGNLRDKHIKWMSTR		225	
SQR_A.a.	FALMLHYELKRRGIRYKVPMTFFITSEPYLGHFGVGGIGASKRLVEDLFAERNIDWIANVA		222	
SQR_T.e.	FLFLAEHALRHHGLRDRVKITFITPEPYVGHLLGIGGLANS DQLTRNLIEKRG IETITNAE		222	
SQR_S.s.	VTLILDDYLRRKRGIRDKTKIIYTPVQ-----GVFGRPITNKFMLRLFEQRGIEVHSPFT		225	
SQR_B.s.	IMYLADDYFRQSGVRDQTNIIFASGLP-----NIFAVKKYADTLEQVIQRKNIETKYRVE		227	
Cons	. : . : : : * : . : :	. : . : : : *		
TCons	. : . : : : * : * : . : :	. : . : : : *		
	*- * +* **	-** + - * *+ +		
SQR_R.c.	IKRVEPGKMVVEEVTEDGTVKPEKELPFGYAMMLPAFRGIKALMGI-EGLVNPRGFVIVD		284	
SQR_A.a.	VKAIEPDKVIYEDL--NGN---THEVPAKFTMFMP SFQGP EVVASAGDKVANPANKMVIV		277	
SQR_T.e.	ITAIEPHRILLRD-----RPVIPFGYSMILPPFRGVFVRA--SGLGNEKGFLPLL		271	
SQR_S.s.	VTSVDPNNKVIES-----QEGEKLFKFDMLIGIPPMMGAKVIED--SGIGDRRRWVPTD		276	
SQR_B.s.	LVEIDGEAKK--ATFEHLDTNERFTLSFDMIHVTPPMGSPAFIKK--SPLADAAGWVDVD		283	
Cons	: : :	: * . : : : :		
TCons	: : : .	: : : * . . : : : : :		
	* * +	+ * * * -+ *		
SQR_R.c.	QH-QQNPTFKNVFAVGVCAIIPPVGP TPVPCGVPKTGEMIESMVTATAHNI GRIVRGLEP		343	
SQR_A.a.	NRCFQNP TYKNIFGVGVTAIPPIEKTPIPTGVPK TGMIEQMAMAVAHNIVNDIRNN-P		336	
SQR_T.e.	P-TLQHPNYPEIYGVGISVHLPPELVTPVPVGVPKTGQMT EEMAIAASHNIAVALGELVA		330	
SQR_S.s.	KFTLRMKDHSNVYVMGDATDLP-----VSKAGSTAD FESYTVAHNIANDIKGNLG		326	
SQR_B.s.	PYTLQHKTYENVFGAGDCTNLP-----TSKTGA AIRKQAPVVAENLLALMNGKPL		333	
Cons	: . : : * . : *	. : * : : : * : :		
TCons	: : : : * . : *	. : * : : : * : :		
	** + * **+	+ *++ + ** * **		
SQR_R.c.	DEV-GSWNAVCLADFGDKGIAFVA-----QPQIPP-----RNVNWSSQGWVHWAKEGF		391	
SQR_A.a.	DKYAPRLSAICIA DFGEDAGFFFA-----DPVIPP-----RERVITKMGKWAHYFKTAF		385	
SQR_T.e.	DPVVPTLDALCFADFGNTGIAYIA-----APVIPEPPGENRR LACALQGLWVSWVKA AF		384	
SQR_S.s.	VKH-YGGDVL CYIATGTDQATYIRFSYTMNESPPPP-----SYVHW-----WGKIMY		372	
SQR_B.s.	QAR-YDGYTSCPLVTGYNKLVLAEFDYDKNPQETFP-----FDQSK		373	
Cons	. * *	.		
TCons	. * *	.		
	** -* *- - **+	* + *- * *		
SQR_R.c.	ERYFMHKLRRGTSETFFYEKAAMKLL-GIDK LKAVK-----KG-----		427	
SQR_A.a.	EKYFLWKVRNGNIAPSFEEKVLEIFLKVHPIELCK---DCEGAPG SRC		430	
SQR_T.e.	ERYFLLKMRWGLGVPWF EQWGLRLFFGLSLVRPLQPTVFPEQQPIMKV		432	
SQR_S.s.	NKMYWTVTAKAVV-----		385	
SQR_B.s.	ERMSMYVLKRNLPIIYWNGMLKGLM-----		399	
Cons	::			
TCons	::			

### Abb. 5.19. Sequenzalignment thermophiler SQR-Proteine

Das Alignment der Sequenzen von SQR R.c. (*R. capsulatus*, Acc. No. CAA66112), SQR A.a. (*A. aeolicus*, Acc. No. NP\_214500), SQR T.e. (*Thermosynechococcus elongatus*, Acc. No. NP\_681079), SQR S.s. (*Sulfolobus solfataricus*, Acc. No. NP\_343961) und SQR B.s. (*Bacillus stearothermophilus* Contig259, University of Oklahoma, *B. stearothermophilus* Genome Blast Server) wurde mit T-COFFEE (Notredame et al., 2000) erstellt.

Die oberste Zeile enthält + an Positionen, welche ein geladene Aminosäure in der *A. aeolicus* Sequenz enthalten, nicht aber in der *R. capsulatus*. Umgekehrt steht - für eine in *R. capsulatus* geladene, aber in *A. aeolicus* ungeladene Position. In beiden Sequenzen geladene Positionen sind mit \* gekennzeichnet. Als geladene Aminosäuren wurden K, R, H, E und D untersucht. cons enthält Markierungen für in allen fünf verglichenen Sequenzen konservierte Positionen, tcons enthält Markierungen für in allen vier thermophilen Sequenzen konservierte Positionen, \* bedeutet Identität, : hohe Ähnlichkeit und . geringere Homologie.

---

Lediglich für sehr kurze Bereiche (z.B. Aminosäureposition 75 bis 84, Abb. 5.19.) lässt sich ein vermehrtes Auftreten von geladenen Aminosäuren wie Lysin, Arginin, Histidin, Glutamat oder Aspartat in der SQR-Sequenz von *A. aeolicus* gegenüber *R. capsulatus* feststellen. Somit kann auf Basis des hier gezeigten Alignments kein für eine Stabilisierung der Tertiärstruktur durch ionische Wechselwirkungen in Frage kommender Bereich oder Aminosäurepaar ausgemacht werden.

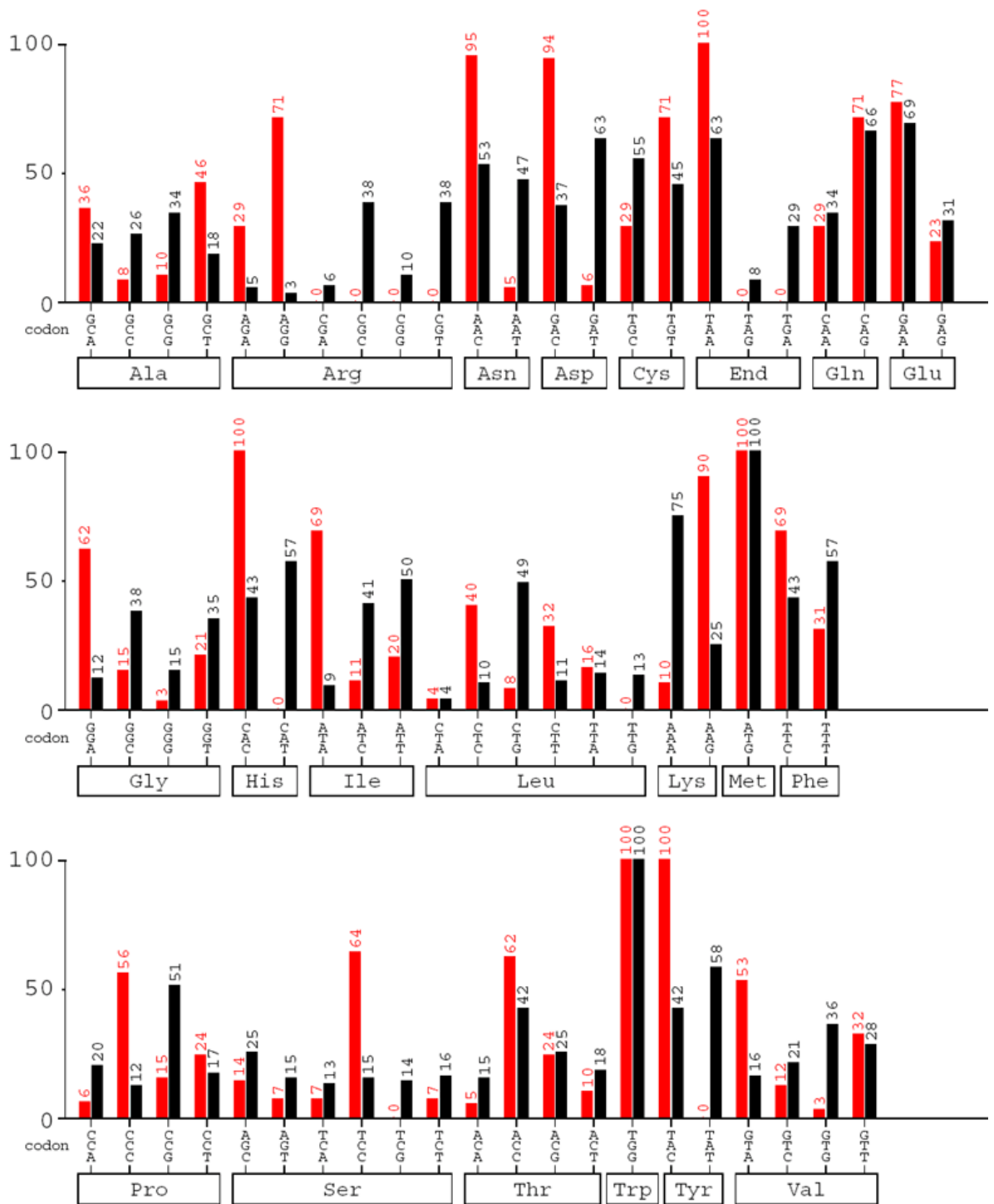
Ein analog durchgeführter Vergleich der FCC-Untereinheiten von *A. aeolicus* und *Allochromatium vinosum* (Alignment nicht gezeigt) konnte ebenfalls keine Bereiche oder in Frage kommenden Aminosäurepaare identifizieren.

## 6. Diskussion

### 6.1. Genadaptation

Die Verfügbarkeit der vollständigen Sequenzinformation des Genoms von *A. aeolicus* (Deckert et al., 1998) erleichterte zu Beginn dieser Arbeit die Identifikation und Amplifikation des für eine Sulfid-Chinon Reduktase kodierenden Gens. *E. coli*-Zellen, die zur heterologen Expression Vektoren mit dem *sqr*-Gen enthielten, zeigten in SDS-PAGE-Analysen lediglich einen sehr geringen SQR-Proteingehalt (Schödl, 2000). Die Expressionsraten ließen sich durch eine Absenkung der Wachstumstemperatur nach Induktion oder durch eine Verringerung der Induktorkonzentration (IPTG) nicht nachweisbar beeinflussen. In der Literatur sind für geringe Proteinexpressionsraten mehrere Gründe beschrieben: so spielen Faltungsstrukturen im 5'-Bereich der mRNA und die Stabilität der mRNA im Expressionsorganismus eine wichtige Rolle (Stülke, 2002, Carrier et al., 1998). Ferner konnte Kane (1995) zeigen, dass die Häufung wenig benutzter Codons die Translation verlangsamen und zum Einbau anderer Aminosäuren führen kann. Obwohl *E. coli* gerade für die heterologe Expression eubakterieller Proteine aufgrund guter experimenteller Zugänglichkeit und phylogenetischer Verwandtschaft sehr geeignet scheint, wurde im Rahmen dieser Arbeit nach nicht zufriedenstellenden Expressionsexperimenten in *E. coli* versucht, das *A. aeolicus* *sqr*-Gen im eukaryotischen System *S. cerevisiae* heterolog zu exprimieren. Für Bäckerhefe sind, ähnlich wie für *E. coli*, ebenso Standardsysteme zur Proteinexpression kommerziell verfügbar. Die im Kapitel 5.1 (S. 16) beschriebenen Induktionstests zeigten, dass sich auch im eukaryotischen Expressionssystem nach Induktion nur geringe Mengen Protein in Western-Blot Analysen nachweisen ließen. Da sich die Molekulargewichte der induzierten Proteine, welche durch Reaktion mit dem Histidin-Tag Antikörper nachgewiesen wurden, stark von dem erwarteten theoretischen Wert unterschieden, wurden keine weiteren Versuche mit dem Hefe-Expressionssystem durchgeführt.

Der Vergleich des Codon-Gebrauchs im *A. aeolicus* *sqr*-Gen mit dem Codon-Gebrauch von *E. coli* und *S. cerevisiae* gab Grund zu der Annahme, dass sich die niedrigen Proteinexpressionsspiegel mit einem unterschiedlich präferenziellen Codon-Gebrauch erklären lassen. Das im Rahmen der Arbeit erstellte Computerprogramm „Graphical Codon Usage Analyser“ errechnet für alle 64 Codons des universellen genetischen Codes einen über alle Codons gemittelten Unterschied der Abweichung vom Codon-Gebrauch des Expressionsorganismus (vgl. Kap. 9.3). Dieser als „mean difference“ bezeichnete Wert ergab für das *A. aeolicus* *sqr*-Gen in *E. coli* 26,2% (Abb. 6.1.) und für das gleiche Gen in *S. cerevisiae* 24,8% (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 6.1. Analyse des Codon-Gebrauchs des natürlichen *sqr*-Gens mit Hilfe des Programms „Graphical Codon Usage Analyser“**

- Verwendung des entsprechenden Codons im natürlichen *A. aeolicus* *sqr*-Gen in Prozent für die jeweilige kodierte Aminosäure.
- Verwendung des entsprechenden Codons in allen kodierenden Bereiche des Genoms von *E. coli* in Prozent für die jeweilige kodierte Aminosäure.

Nach der Anpassung des Gens an den Codon-Gebrauch von *E. coli* (Kap. 5.2, S. 17) sank der „mean difference“ Wert für das *casqr*-Gen in *E. coli* als Expressionsorganismus auf 4,3%. Dabei sank zufällig auch der Wert für das *casqr*-Gen in *S. cerevisiae* auf 15,8%. Unter der Annahme, dass der unterschiedliche Codon-Gebrauch hauptverantwortlich für die geringen Expressionsraten ist, ist der Zahlenwert der „mean difference“ ein Maß für die Wahrscheinlichkeit hoher Proteinexpressionsraten.

Wie von Freire-Picos et al. (1995) beim Vergleich der Cytochrom c Sequenzen verschiedener Pilze gezeigt wurde, korreliert der Codon-Gebrauch meist stark mit phylogenetischer Verwandtschaft. Daneben spiegelt der Codon-Gebrauch die natürlich vorkommenden tRNA-Konzentrationen wieder (Ikemura, 1985), und korreliert ferner mit dem GC-Anteil der kodierenden Bereiche der Genome (Takeuchi et al., 2003). Dabei sind natürliche Umgebungsbedingungen Teil der treibenden Kraft der Selektion und Adaptation des Codon-Gebrauchs im Gesamtgenom eines Organismus (Lynn et al., 2002). So unterscheidet sich das Muster des Codon-Gebrauchs innerhalb thermophiler Prokaryoten von Mustern bei mesophilen Prokaryoten. Da sich diese Muster in allen Bereichen des Genoms feststellen lassen, kann ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um Phänomene handelt, welche durch lateralen Gentransfer begründet werden könnten (Lynn et al., 2002). Die Unterschiede im präferenziellen Codon-Gebrauch von Thermophilen und Mesophilen begründet Lynn et al. (2002) nicht durch stärkere Codon-Anticodon Wechselwirkungen, sondern durch höhere mRNA-Stabilität. Dies bekräftigend wird dem gehäuft Vorkommen von Purin-Basen in RNA-Molekülen thermophiler Bakterien (Lao & Forsdyke, 2000) ein stabilisierender Einfluß auf das einzelsträngige Vorkommen von mRNA-Molekülen zugewiesen.

Dennoch finden sich Beispiele dafür, dass natürliche Gene aus *A. aeolicus* mit ähnlichen Werten für die „mean difference“ problemlos in *E. coli* exprimiert werden konnten. So wurde beispielsweise das *kdsA*-Gen (Acc. No. AE000673) mit einem „mean difference“ Wert von 21,6% für die Expression in *E. coli* ohne Adaptation des Codon-Gebrauchs exprimiert (Dewel et al., 1999). Zusammenfassend zeigt sich, dass die Proteinexpression von mehreren Komponenten und von unterschiedlich eingehenden Faktoren abhängt, welche es erschweren, verlässliche Angaben über Proteinexpressionsraten in heterologen Systemen vorherzusagen. Im hier vorliegenden Fall führte die Anpassung des Codon-Gebrauchs des *sqr*-Gens aus *A. aeolicus* an *E. coli* zu Proteinexpressionsraten, welche eine Reinigung im Milligrammmaßstab ermöglichten. Dies war die Grundlage für eine eingehende biochemische Charakterisierung der Sulfid-Chinon Reduktase aus *A. aeolicus*.

## 6.2. Heterologe Expression und Reinigung

Da bei Verwendung verschiedener Expressionvektoren unterschiedlicher Hersteller auch bei der Expression ehemals problemlos exprimierbarer Gene Probleme auftraten (Griesbeck C., Schödl T. unveröffentlicht), wurde am Beginn dieser Arbeit mit einem neu vom Hersteller (New England Biolabs) bezogenen Vektor pMal-c2X gearbeitet. Das in Bezug auf seine Restriktionsschnittstellen für diesen Vektor synthetisierte Gen *casqr* zeigte in ersten Expressionsversuchen hohe Proteinexpressionsraten. Bereits in der Coomassie-Färbung der SDS-PAGE-Analyse gesamter Zellen war ein Protein der zu erwarteten Größe sichtbar. Dabei handelte es sich um ein Fusionsprotein von Maltosebindeprotein und *A. aeolicus* SQR mit einem apparenten Molekulargewicht von 90 kDa (nicht gezeigt). Da also mit dem *casqr*-Gen in *E. coli* die Expression des SQR-Proteins in ausreichendem Maßstab möglich war, zeigte sich dass die theoretischen Überlegungen und die „*in silico*“ Werte für die Wahrscheinlichkeit hoher Expressionsraten („mean difference“) richtig waren. Obwohl der große Maltosebindeprotein-Tag die Aktivität in Membranen nicht störte, wurde von einer Charakterisierung des Fusionsproteins abgesehen. Es gelang nämlich ein Expressionskonstrukt zur Reinigung über Hitzedenaturierung und ein weiteres zur Reinigung über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie zu klonieren. Auch diese Konstrukte zeigten bereits in der Coomassie-Färbung der SDS-PAGE-Analyse ganzer Zellen prominente Banden der zu erwartenden Größe. Die apparenten Molekulargewichte in SDS-PAGE (Abb. 5.4.) und die dazugehörigen theoretischen Werte dieser beiden Proteine zeigt folgende Tabelle:

	MW apparent	MW theoretisch*	pl theoretisch*
ASQR	45 kDa	47,449 kDa	6,53
AHSQR	47 kDa	48,860 kDa	6,32

\* berechnet mit [http://us.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html)

Dabei ist der theoretische Unterschied des Molekulargewichtes, welcher durch die sechs Histidine und die Enterokinase-Schnittstelle (H<sub>6</sub>D<sub>4</sub>K 1,4 kDa) bedingt ist, im Experiment im Rahmen der Ablesegenauigkeit feststellbar (Abb. 5.4., S. 20). Die apparente Molekulargröße war stets geringer als die theoretische zu erwartende Größe. In SDS-PAGE-Analysen des aus *R. capsulatus* isolierten Proteins unterschieden sich die Konstrukte mit und ohne Reinigung-Tag nicht in ihrem apparenten Molekulargewicht (beide 55 kDa), lagen insgesamt aber um ca. 7 kDa höher als der theoretische errechnete Wert (48,4 kDa) (Schütz et al., 1997, Griesbeck, 2001). Ein möglicher Grund für die für ASQR und AHSQR gefundenen, niedrigen apparenten Molekulargewichte ist eine im Vergleich zur *R. capsulatus* SQR erhöhte Tendenz, SDS zu binden.

Nachdem es nun möglich war, Protein in zur Charakterisierung ausreichenden Mengen heterolog zu exprimieren, standen mehrere Möglichkeiten der Reinigung zur Wahl: einerseits die Reinigung über Affinitätschromatographie mittels Amylosesäule oder andererseits über Ni<sup>2+</sup>-NTA Affinitätschromatographie wie im Falle der *R. capsulatus* SQR (Griesbeck, 2001). Ferner kam die Möglichkeit der Reinigung über Hitzedenaturierung in Frage, welche für thermostabile Proteine in mesophilen Expressionssystemen beschrieben war (z.B. in Duewel et al., 1999). Aufgrund des leicht zu erreichenden hohen Grades an Reinheit (vgl. Abb. 5.3., S. 19) bei gleichzeitig niedrigem experimentellen und finanziellen Aufwand wurde im Rahmen dieser Arbeit fast ausschließlich die Methode der Reinigung durch Hitzedenaturierung gewählt. Sie bietet ferner den Vorteil, dass das Protein ohne artifizielle Ergänzung vorliegt, deren Einfluss auf intrinsische Proteinparameter schwer abzuschätzen ist. Für den Fall des SQR-Proteins aus *R. capsulatus* ist der Einfluß des Reinigungs-Tags mit Proteaseschnittstelle als gering einzuschätzen (Griesbeck, 2001).

### 6.3. Spezifische Aktivität und Substrataffinität

Die spezifische Aktivität bei Raumtemperatur von 3,8 U/mg der SQR aus *A. aeolicus* war unabhängig vom N-terminal angebrachten Reinigungstag (vgl. Kap. 5.4.1, S. 20) und entsprach fast dem in Membranen gefundenen Wert von 3,5 U/mg (Nübel et al., 2000). Dabei wäre eigentlich eine deutliche Aktivitätszunahme zu erwarten gewesen, da die Reinheit der heterolog exprimierten ASQR im Vergleich zu den Messungen in Gesamtmembranen deutlich höher ist. Beim vergleichbaren Fall der *R. capsulatus* SQR stieg der Wert von 0,1 U/mg (Shahak et al., 1994) für die Messung in Gesamtmembranen auf bis zu 50 U/mg (Griesbeck, 2001) für die Messung des über Affinitätschromatographie gereinigten, heterolog exprimierten Proteins. Ein entscheidender Grund für die unerwartet niedrige spezifische Aktivität ist der geringe FAD-Gehalt von maximal 30% (Kap. 5.4.2, S. 21). Folglich kann davon ausgegangen werden, dass der wahre Wert für die spezifische Aktivität mindestens um den Faktor drei höher ist, wenn jedes der SQR-Moleküle ein FAD enthalten würde. Auf die möglichen Gründe für den geringen FAD-Gehalt wird im Kapitel 6.4 (S. 51) näher eingegangen. Desweiteren kann von einem negativen Einfluss der künstlichen Detergenzumgebung auf die Proteinaktivität ausgegangen werden. Dabei kann das Detergenz sowohl Einfluss auf die Struktur des Monomers als auch auf die Dimerisierungseigenschaften nehmen, und somit die Aktivität vermindern. Dieser Detergenzeinfluss konnte z.B. bei der Cytochrom c Oxidase aus Rindherz gezeigt werden (Bolli et al., 1985).



Die Substrataffinitäten gegenüber Sulfid und Chinon bewegen sich in einem für bakterielle SQR-Enzyme typischen Bereich. Der Wert von 9,9  $\mu\text{M}$  für die Affinität gegenüber Sulfid (Abb. 5.5., S. 23) deckt sich gut mit dem in Membranen gefundenen Wert von 11  $\mu\text{M}$  (Nübel et al., 2000). Er befindet sich im mittleren Bereich der bekannten Werte für Sulfidaffinität, die von 5  $\mu\text{M}$ , für das *R. capsulatus* Protein bis 26  $\mu\text{M}$  für das in *Paracoccus denitrificans* Membranen beschriebene Protein reichen (Shahak et al., 1994, Schütz et al., 1998b).

Das natürlicherweise in *A. aeolicus* vorkommende Chinon wurde noch nicht aus dem Organismus selbst isoliert. Die Tatsache dass der *bc*-Komplex aus *A. aeolicus* ein low-potential Rieske-Protein enthält (Schütz et al., 2003), deutet darauf hin, dass es sich beim natürlichen Elektronenakzeptor wahrscheinlich um ein Menachinon handelt, wie dies auch für andere fakultativ-anaerobe, gram-negative Bakterien beschrieben ist (Collins & Jones, 1981). Aufgrund der geringen Löslichkeit der isoprenoid-substituierten Menachinone wurde im Rahmen dieser Arbeit Menadion verwendet, welches keine Seitenkette an der 3 Position des Naphtochinongrundsystems trägt (vgl. hierzu Lemma et al., 1990). Die gemessene Substrataffinität gegenüber Menadion ist mit einem  $K_m$ -Wert von 5,0  $\mu\text{M}$  (Abb. 5.7., S. 25) etwas höher als der für den artifiziellen Elektronenakzeptor dUQ gefundene Wert von 6,0  $\mu\text{M}$  (Abb. 5.6., S. 24). Beide befinden sich im Wertebereich der Chinonaffinitäten bakterieller Chinone: 2  $\mu\text{M}$  für dUQ bei *R. capsulatus* (Shahak et al., 1994) und 32  $\mu\text{M}$  für Plastochinon-1 bei *Oscillatoria limnetica* (Arieli et al., 1994). Unter Berücksichtigung der Messgenauigkeit ist der gefundene Affinitätsunterschied von 1  $\mu\text{M}$  nicht groß genug um von einer Präferenz für das dem natürlichen Chinon ähnelichere Menadion sprechen zu können.

Die Substrataffinitäten der bakteriellen SQR-Proteine im ein- bis zweistelligen mikromolaren Bereich, unterscheiden sich sehr stark von dem Wert von 2 mM für das HMT2-Protein aus *S. pombe* (Vande Weghe & Ow, 1999). Dieses eukaryotische SQR-ähnliche Protein weist an der in bakteriellen SQR-Proteinen dem Valin Nummer 300 entsprechenden Position ein Aspartat auf (Nummerierung gemäß Griesbeck, 2001). Eine Mutation des Valins in der *R. capsulatus* SQR zu Aspartat führte zu einer drastischen Verschlechterung der Sulfidaffinität auf einen  $K_m$ -Wert von ca. 400  $\mu\text{M}$  (Griesbeck, 2001). Der entscheidende Einfluss der Aminosäure Valin in der Position 300 deckt sich mit den Daten für das *Synechocystis* sp. PCC6803 SQR-Homologe. Obwohl es sich hier um ein SQR-homologes Protein aus einer Blaualge handelt, weist die Aminosäuresequenz dort ein für Eukaryoten typisches Aspartat auf (Theissen et al., 2003). Der ermittelte  $K_m$ -Wert für Sulfid von 290  $\mu\text{M}$  (Shibata H., persönliche Mitteilung) entspricht den Erwartungen für ein SQR-Homologes mit einem Aspartat an der Position 300. Erst die biochemische Charakterisierung weiterer eukaryotischer SQR-Homologer und deren Mutation von Aspartat zu Valin können die Beteiligung der Position am Reaktionsmechanismus weiter aufklären. Flavocytochrom *c*, welches an der dem Valin 300 entsprechenden Position ein Aspartat besitzt (vgl. Abb. 5.15.,

Aminosäureposition 294), zeigt einen unerwartet niedrigen  $K_m$ -Wert gegenüber Sulfid von  $12,5 \mu\text{M}$  (Cusanovich et al., 1991). Zum Verständnis der zugrunde liegenden Prozesse sollte die Bestimmung des elektrochemischen Mittelpunktspotentials von eukaryotischen SQR-Proteinen oder mutierter bakterieller Enzyme beitragen können.

Der in Abb. 5.10. (S. 28) gezeigte Verlauf für die Abhängigkeit der Aktivität der ASQR vom pH-Wert entspricht in seiner Form etwa demjenigen, welcher für die aus *R. capsulatus* isolierte SQR bekannt war (Griesbeck, 2001). Zwar ist das Maximum der Aktivität der ASQR um etwa eine pH-Einheit ins Basische verschoben, der Wert für die halbmaximale Intensität im Basischen entspricht aber nahezu demjenigen des *R. capsulatus* SQR-Proteins. Der steile Abfall der Aktivität im Basischen und das relativ langsame Abfallen der Aktivität im Säuren deuten auf eine Präferenz für  $\text{H}_2\text{S}$  hin (Schütz, 1997). Da das Maximum der Aktivität aber bei pH 7,7 zu finden ist, und ca. 80% des Sulfids dort einfach deprotoniert als  $\text{HS}^-$  vorliegen, könnte die Reaktion selbst trotz der Präferenz für  $\text{H}_2\text{S}$  im leicht basischen begünstigt sein. Mit einem pK-Wert von 7,0 für die Abgabe des ersten Protons und einem Wert von 12,9 für die Abgabe des Zweiten (Holleman et al., 1995) ist das für alle SQR-Proteine gefundene lokale Minimum bei pH 5,5 auf eine Eigenschaftsänderung des Proteins und nicht des Substrates zurückzuführen. So könnte die Protonierung eines Reaktionsintermediates durch eine Aminosäure im Neutralen und leicht Säuren bei pH 5,5 durch Protonen begünstigt werden (Griesbeck, 2001).

Überraschender Weise wurde ein Anstieg der Aktivität bei Erhöhung der Salzkonzentration auf mehr das Doppelte beobachtet (Abb. 5.11., S. 28), welcher analog auch für das *R. capsulatus* SQR-Protein beschrieben wurde (Mederer, 2000). Da sich diese Aktivitätserhöhung bei mesophilen und thermophilen Proteinen in nahezu gleichem Ausmaß finden, scheint es sich nicht um eine spezifische Eigenschaft des SQR-Proteins aus dem thermophilen Organismus zu handeln. Ob sich ein Unterschied zwischen ein- und mehrwertigen Ionen und ein Einfluss der Inkubationszeit bei hoher Salzkonzentration feststellen lassen muss noch untersucht werden. Eine erhöhte Aktivität von Proteinen aus *A. aeolicus* bei moderaten Salzkonzentrationen von 150 bis 350 mM wurde auch von Lim et al. (2001) gefunden. Dies lässt sich eventuell mit der Zunahme der Löslichkeit von Salzen bei Erhöhung der Lösungsmitteltemperatur und somit mit der Anpassung an die Umgebungsbedingungen im natürlichen Habitat begründen.

#### 6.4. FAD-Gehalt des isolierten ASQR-Proteins

Wie für alle anderen Vertreter der Glutathion-Reduktase Familie beschrieben, ist anzunehmen, dass auch die ASQR ein FAD-Molekül pro Monomer enthält. Im Gegensatz zum homologen FCC ist es aber nicht kovalent, sondern nur durch andere Wechselwirkungen (z.B. elektrostatische Anziehung) an das Protein gebunden. Diese Art der Bindung konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Schwefelsäureextraktion des FAD aus ASQR nachgewiesen werden (vgl. Kap. 5.4.2, S. 21). Obwohl Flavoproteine normalerweise ein Flavinmolekül pro Proteinuntereinheit enthalten, zeigten quantitative Bestimmungen bei ASQR (wie auch bei der *R. capsulatus* SQR, Griesbeck, 2001) ein deutlich geringeres Besetzungsverhältnis. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden nach Schwefelsäureextraktion des FAD aus ASQR nur sehr geringe FAD-Gehalte von 10 bis 25% biochemisch ermittelt. Da bei der Denaturierung des Proteins mit Schwefelsäure der Chromophor eventuell durch das ausfallende Protein eingeschlossen wird und somit nicht quantitativ im Überstand der Extraktion zu finden ist, wurde versucht, den Cofaktor unter schonenderen Bedingungen freizusetzen. Bei genügend langer Inkubation der ASQR mit der unspezifischen Protease Pronase sollte der Chromophor FAD durch den zunehmenden Abbau des SQR-Proteingerüsts freigesetzt werden. Dieser Abbau sollte in einem ersten Schritt durch SDS-PAGE nachgewiesen werden. Eine zunehmende Verschmierung der SQR-Bande zu kleineren Peptidfragmenten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit sollte den fortschreitenden Abbau des Proteins erkennbar machen. Da dies nicht beobachtet werden konnte wurde versucht den FAD-Gehalt anhand des Absorptionsunterschiedes von oxidiertem und reduziertem Form aus dem Spektrum der Redoxtitration abzuschätzen (vgl. Kap. 5.4.8, Abb. 5.12. A, S. 29). Diese Auswertung ergab, dass in etwa ein Drittel der ASQR-Proteine den Cofaktor FAD beinhalten. Für die deutliche Unterbesetzung des heterolog exprimierten Proteins ist unter Umständen die mangelnde Fähigkeit von *E. coli* zur FAD-Biosynthese verantwortlich. Dabei wird durch das effiziente Induktionssystem aus gekoppeltem Laktosepromotor und T7-Promotor die Proteinbiosynthese so stark erhöht, dass eine Besetzung jedes Monomers durch ein FAD-Molekül nicht mehr gewährleistet werden kann. Bei Untersuchungen des heterologen Expressionssystems für die *R. capsulatus* SQR beeinflussten weder der Zusatz von FAD bzw. FMN in das bakterielle Kulturmedium noch geänderte Temperaturbedingungen nach Induktion mit IPTG den FAD-Gehalt wesentlich (Schödl, 2000). Ein von Griesbeck (2001) durch Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie diskutierter Cofaktorverlust kann für den hier behandelten Fall der ASQR ausgeschlossen werden, da die Reinigung durch Hitzedenaturierung erfolgte. Die Resistenz gegenüber einem Verdau mit Pronase lässt auf eine Unzugänglichkeit und räumliche Kompaktheit der ASQR schließen. Erhöhte Packungsdichte (Tanner et al., 1996) und erhöhte Stabilität gegenüber chemischer Modifikation, ist eine für thermostabile Proteine

bekannte Eigenschaft (Jaenicke & Böhm, 1998). Auch die Tatsache, dass sich unter denaturierenden SDS-PAGE-Bedingungen (vgl. Abb. 5.4., S. 20) erst nach Zusatz von Mercaptoethanol eine Einzelbande im Gel zeigt, deutet auf Kompaktheit der Tertiärstruktur und Unzugänglichkeit eventueller Disulfidverbrückungen des Proteins hin. Dieser Unterschied konnte für die heterolog exprimierte *R. capsulatus* SQR nicht nachgewiesen werden (Griesbeck C., persönliche Mitteilung).

## 6.5. Temperaturabhängigkeit der Aktivität und Stabilität

Sulfidabhängige Chinonreduktion in Abwesenheit des Katalysators SQR stellt erst oberhalb von 50°C einen die Messung komplizierenden Faktor dar. Die Zunahme der Aktivität mit steigender Temperatur und die ebenfalls mit der Temperatur zunehmende Denaturierung des Proteins führen gewöhnlich zur Entstehung eines Maximums. Dabei zeigen Proteine oft ein in etwa auf die im natürlichen Habitat herrschende Durchschnittstemperatur angepasstes Aktivitätsprofil. So wurde für das aus *R. capsulatus* isolierte SQR-Protein ein Temperaturoptimum der Aktivität von 45°C ermittelt. Dieses ist um 12°C höher als die optimale Wachstumstemperatur von 33°C (Hansen & Van Gernerden, 1972). Schon die Messung der Aktivität der *A. aeolicus* SQR in Membranen zeigte eine Optimierung der Aktivität auf die deutlich höhere natürliche Umgebungstemperatur. Die hier durchgeführten Messungen der Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur zeigen ein stetes Ansteigen der Aktivität bis zu 90°C (vgl. Abb. 5.8., S. 26) und somit eine Optimierung auf die natürlichen Umgebungsbedingungen. Die relativ niedrigen spezifischen Aktivitäten im Bereich unterhalb von 35°C lassen sich einerseits auf die negativen Einflüsse der künstlichen Detergenzumgebung (vgl. Kap. 6.3, S. 48) und andererseits auf die nicht-physiologische Umgebungstemperatur zurückführen. So zeigen die meisten Proteine aus thermostabilen Organismen im Bereich unter 30°C sehr niedrige Aktivitäten, und für Enzyme aus *A. aeolicus* sind Temperaturoptima der spezifischen Aktivität von 90°C auch in anderen Fällen beschrieben (Iyer et al., 2002). Für die *A. aeolicus* SQR ist die stärkste Zunahme der spezifischen Aktivität für den Bereich zwischen 40 und 60°C zu verzeichnen. Von 80 bis 90°C nimmt die Aktivität nur noch geringfügig weiter zu, dennoch wird auch in diesem Bereich kein Maximum der Umsatzgeschwindigkeit erreicht.

Die chemische Hintergrundreaktion, also die nicht-enzymkatalysierte Reduktion von Chinon durch Sulfid, wurde ab 50°C messbar. Bei 90°C ist sie zwar leicht messbar (40 U), aber ihr Anteil an der enzymkatalysierten Gesamtreaktion liegt unter 5%. Für das ASQR-Enzym beträgt die spezifische Aktivität bei 90°C 1200 U/mg. Diese ist somit 36-fach höher als die maximale spezifische Aktivität des *R. capsulatus* SQR-Proteins beim Temperaturoptimum (33 U/mg bei 45°C, Mederer, 2000). Die mit Erhöhung der Temperatur zunehmende

Destabilisierung der energiereichen Stoffwechselzwischenprodukte, wird dabei durch einen Anstieg der spezifischen Aktivität kompensiert. Nur so kann der für die ATP-Synthese nötige elektrochemische Protonengradient aufrechterhalten werden. Ansonsten würde die bei höheren Temperaturen erleichterte Diffusion der Protonen durch die Membran schnell zum Abfallen des Protonengradienten führen.

Neben der Optimierung der Aktivität auf die durchschnittliche Umgebungstemperatur müssen Enzyme thermophiler Organismen erhöhte Stabilität gegenüber Hitzedenaturierung aufweisen. Für das heterolog exprimierte ASQR-Protein zeigte sich erst nach einstündiger Inkubation bei 90°C ein Abfallen der Aktivität auf unter 90% des Ausgangswertes (vgl. Abb. 5.9., S. 27). Das zu 38% auf Ebene der Aminosäuren identische *R. capsulatus* SQR-Protein zeigt schon nach einstündiger Inkubation bei nur 50°C ein Abfallen des Aktivitätswertes auf unter 25% des Ausgangsniveaus (Griesbeck, 2001). Dennoch ist der für das ASQR gefundene Wert, im Vergleich zu Thermostabilitätswerten für andere Proteine aus *A. aeolicus* nicht maximal: So weist die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, bezogen auf die Anfangsaktivität, Halbwertszeiten von 24 h bei Inkubation bei 90°C und 12 h bei Inkubation bei 100°C auf.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die SQR-Sequenzen von drei bakteriellen thermophilen Organismen und einem archaeellen thermophilen Organismus verglichen. Die Untersuchung konnte keine Hinweise auf ein allen gemeinsames Stabilisierungsmotiv liefern. Dies und die zum Teil große phylogenetische Entfernung deuten auf eine Adaptation der Proteine im jeweiligen Organismus und nicht auf einen monophyletischen Ursprung der Thermostabilität der untersuchten SQR-Proteine hin. Die Thermostabilität von Proteinen lässt sich gemäß Jaenicke und Böhm (1998) auf Beiträge folgende Parameter zurückführen:

- (1) Packungseffizienz, hauptsächlich durch van der Waals' Wechselwirkungen vermittelt
- (2) vernetzende Strukturen von Ionenpaaren und Wasserstoffbrückenbindungen
- (3) Verminderung konformativer Spannungen (vor allem in Loop-Bereichen)
- (4) Beständigkeit gegen chemische Modifikation.

Da insgesamt von einem kumulativen Effekt ausgegangen werden muss und sich die Beiträge der einzelnen Parameter von Protein zu Protein unterscheiden, wäre eine endgültige Aussage darüber nur nach Aufklärung der Raumstruktur möglich. Unterschiedliche Beiträge der Packungseffizienz und der Konformationsspannungen könnten über Moleküldynamik-Methoden abgeschätzt werden. Eine Untersuchung des Faltungsmodells auf ionische Wechselwirkungen, z.B. auf räumliche Nähe eines Glutamatrestes mit einem Argininrest, könnte den Einfluss von vernetzenden Strukturen klären. Ohne die Kenntnis der Raumstruktur konnte der Vergleich der Primärsequenzen (vgl. Abb. 5.19., S. 41) keine hierfür in Frage kommenden Aminosäurepositionen liefern.

## 6.6. Redoxeigenschaften der SQR

Obwohl das primäre Oxidationsprodukt der enzymatischen SQR-Reaktion noch nicht mit Sicherheit bekannt ist, gibt es zwei experimentelle Hinweise darauf, dass es sich bei der durch die SQR katalysierten Redoxreaktion um eine Zweielektronenübertragung handelt. Einerseits weist die Stöchiometrie der SQR-Reaktion ein molares 1:1 Verhältnis von Sulfid zu dUQ auf (Griesbeck, 2001) und andererseits zeigt die Redoxtitration einen für Zweielektronenübergänge charakteristischen Verlauf (ebd. und Abb. 5.12. C, S. 30). Messungen in Membranen von *A. aeolicus* und *P. denitrificans* deuten ebenfalls auf ein molares eins zu eins Verhältnis von Sulfid und Chinon hin (Nübel et al., 2000, Schütz et al., 1998b). Freies FAD weist ein Mittelpunktspotential von -220 mV auf (Thauer et al., 1977), für proteingebundenes FAD sind hingegen Werte von -495 mV für das Redoxpaar  $\text{FADH}^+/\text{FADH}^{\cdot-}$  (Ghisla & Massey, 1989) bis +196 mV für das Redoxpaar  $\text{FAD}/\text{FAD}^{\cdot-}$  (Byron et al., 1989) bekannt. Für das zur SQR strukturell ähnliche FCC aus *A. vinosum* wurde ein Redoxpotential von -26 mV ermittelt. Das Redoxpotential der Oxidation von Sulfid zu Schwefel liegt bei -270 mV, das der Reaktion von Sulfid zu Disulfid bei -200 mV (Brune, 1989). Beide sind somit weit negativer als die Mittelpunktspotentiale der Reduktion von UQ zu  $\text{UQH}_2$  (+113 mV) und von MQ zu  $\text{MQH}_2$  (-74 mV) (Thauer et al., 1977). Für einen Redoxkatalysator, der den Elektronenübergang vom Sulfid zum oxidierten Chinon vermittelt, wäre nun ein dazwischenliegendes Potential zu erwarten.

Die an der ASQR durchgeführten spektroelektrochemischen Messungen ergaben einen Wert von -60 mV für einen Zweielektronenübergang (Abb. 5.12., S. 29). Für den Fall des Elektronenübergangs vom Redoxpaar Sulfid/Disulfid zum Paar UQ/ $\text{UQH}_2$  liegt dieser Wert zwischen den Mittelpunktspotentialen der Reaktanden. Im Fall des MQ entspricht der Wert für das Mittelpunktspotential des Katalysators annähernd dem des Elektronenakzeptors ( $E_0(\text{ASQR})$  -60 mV,  $E_0(\text{MQ})$  -74 mV). Da das effektive Potential aber auch von den Konzentrationsverhältnissen der jeweiligen Redoxpaare bestimmt wird ist eine Reaktion des reduzierten Flavins mit dem oxidierten Menachinon trotz des um 14 mV negativeren Potentials von MQ möglich, falls dieses im Überschuss vorliegt.

## 6.7. Photophysikalische Eigenschaften

Sowohl der FAD-Chromophor, als auch der FMN-Chromophor, zeigen von Protein zu Protein unterschiedliche Änderungen spektroskopischer Eigenschaften bei Belichtung: so ist die Bildung von Charge-Transfer Komplexen und von Addukten mit Cysteinen ein weit verbreiteter Reaktionsmechanismus. Innerhalb der Glutathion-Reduktase Familie kommt es zum Beispiel bei der LipDH zur Bildung eines kovalenten Cystein-Flavin(C4a)-Adduktes (Thorpe & Williams, 1981). Diese Adduktbildung ist auch für die LOV-Domänen aus

Phototropinen mit dem C4a-Atom eines Flavinmononukleotids beschrieben (Fedorov et al., 2003). Voraussetzung für eine Adduktbildung ist in beiden Fällen eine reaktive Vorstufe. Im Fall der LOV-Proteine erfolgt die Adduktbildung durch photochemische Anregung des FAD-Moleküls in den reaktiven Triplettzustand. Im Fall der LipDH und TRR reagiert das durch eine Base nahe des aktiven Zentrums deprotonierte Cystein in einem nukleophilen Angriff mit dem C4a-Atom des FAD-Moleküls, unter vorhergehender Charge-Transfer Komplexbildung (Thorpe & Williams, 1981). Eine Adduktbildung sollte in jedem Fall eine Änderung des Fluoreszenzspektrums nach sich ziehen.

Das Anregungsspektrum der AHSQR (Abb. 5.13) zeigt einen zu anderen SQR-Proteinen ähnlichen Verlauf mit Maxima bei 290, 370 und 470 nm (Schütz, 1997), wobei der Peak bei 290 nm hauptsächlich auf die aromatischen Aminosäuren und nicht auf den Cofaktor zurückzuführen ist. Die Intensität der Peaks wird durch die Zugabe von Sulfid gesenkt, und kann durch die darauffolgende Zugabe von Chinon wieder gesteigert werden (nicht gezeigt). Das gleiche SQR-typische Verhalten bei Sulfidzugabe zeigt der charakteristische 520 nm FAD-Emissions-Peak im Fluoreszenzspektrum bei Anregung mit 450 nm. Im freien FAD entspricht dieses Verhalten, der Fluoreszenzabnahme beim Übergang vom oxidierten zum reduzierten Zustand. Weder die Fluoreszenzintensitäten im Anregungs- noch im Emissionsspektrum bei Anregung mit 450 nm konnten durch intensive Belichtung mit unterschiedlichen Lichtquellen verändert werden. Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus der SQR lassen sich aber aufgrund der niedrigen Zeitauflösung der hier durchgeführten Messungen nicht ziehen. Durch spektroskopische Messungen mit höherer zeitlicher Auflösung könnte eventuell die Verwandtschaft der SQR-Proteine zu Flavoproteinen wie GR und LipDH weiter belegt werden. Diese könnten dann den von Griesbeck et al. (2002) vorgeschlagenen, reduktiven Reaktionsmechanismus der SQR stützen oder unwahrscheinlicher machen. Die hier durchgeführten Messungen lieferten keinen Anhaltspunkt für eine lichtinduzierte Adduktbildung zwischen einem Cystein-Aminosäurerest des Proteins und dem C4a-Atom des Isoalloxazinrings, wie sie z.B. für die Phototropine beschrieben ist (Crosson et al., 2003). Die C4a-Adduktbildung bei Vertretern der Glutathion-Reduktase Familie, welche allesamt keine Photorezeptoren darstellen, erfolgt lichtunabhängig (Williams Jr., 1992). In zukünftigen Experimenten könnte die spektroskopische Untersuchung der SQR-Proteine mit höherer zeitlicher Auflösung Anhaltspunkte für den von Griesbeck et al. (2002) vorgeschlagenen Mechanismus liefern.

## 6.8. Strukturelle Eigenschaften

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur stellt einen zentralen Punkt in der Erforschung des Reaktionsmechanismus eines Enzyms dar. Obwohl die Aminosäuresequenz die

Raumstruktur bestimmt, gibt es für ein und dasselbe Faltungsmuster zum Teil sehr unterschiedliche Primärsequenzen. Ab einem Schwellenwert von 30% Identität der Aminosäuresequenz, zeigen die Proteine jedoch Ähnlichkeiten in ihrer dreidimensionalen Struktur (Dym & Eisenberg, 2001). Innerhalb der Familie der Glutathion-Reduktasen konnte trotz oftmals geringerer Sequenzidentität (im Durchschnitt ca. 25%), eine große Ähnlichkeit der Raumstrukturen festgestellt werden (Mathews, 1991, Van Driessche et al., 1996). Neben der strukturellen Verwandtschaft lässt sich innerhalb dieser Familie auch eine hohe funktionell-mechanistische Gleichartigkeit feststellen. Im aktiven Zentrum findet sich in der Nähe des Cofaktors FAD eine aus zwei Cysteinresten gebildete redoxaktive Disulfidgruppe. Durch Mutationsexperimente der SQR von *R. capsulatus* (Griesbeck et al., 2002) wurden drei an der reduktiven Halbreaktion beteiligte Cysteine gefundenen. Zwei davon liegen an identischen Positionen der aus FCC bekannten redoxaktiven Disulfidbrücke. Die hohe strukturelle Verwandtschaft von FCC und SQR konnte durch Circular-Dichroismus Spektren erstmals von Griesbeck (2001) im Experiment gezeigt werden. Dabei unterstreichen die annähernd gleichen Anteile der Sekundärstrukturelemente die Schlussfolgerungen auf strukturelle Homologie, welche aus der Analyse der Aminosäuresequenzen gezogen wurden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die SQR-Proteine gemäß der von Dym und Eisenberg (2001) vorgenommenen Unterteilung der Vertreter der GR-Familie in die Untergruppe GR<sub>1</sub> einordnen lassen. Wie im FCC fehlt auch der SQR die für die Vertreter der GR<sub>1</sub>-Gruppe sonst konservierte NAD(P)<sup>+</sup> Bindedomäne. Dies lässt sich aber leicht dadurch erklären, dass für beide Enzyme *in vivo* andere Elektronenakzeptoren vorgesehen sind. Gemeinsames Merkmal aller Vertreter der GR<sub>1</sub>- und GR<sub>2</sub>-Familie ist die Bindung des FAD-Chromophors im gestreckten Zustand (Dym & Eisenberg, 2001). In dieser Konformation ist die Isoalloxazinuntereinheit räumlich weit von der Adeninuntereinheit des FAD-Moleküls entfernt. Mit Ausnahme des FCC und der Fumarat-Reduktase ist der Cofaktor FAD bei Vertretern der GR-Familie nicht kovalent gebunden (ebd.). Somit ist zumindest hier für FCC und SQR ein bemerkenswerter Unterschied festzustellen, dessen Einfluss auf das Faltungsmuster aber nicht maßgeblich sein dürfte.

Schon alleine die Tatsache, dass es sich bei FCC um ein lösliches und bei der SQR um ein membranassoziertes Protein handelt, lässt auf einen wesentlichen Unterschied in peripheren Bereichen der Struktur schließen. Durch eine Analyse der Dimerisierungsdomäne konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass für die homodimere Organisation von FCC und SQR ein anderer Bereich der Primärsequenz in Frage kommt, als er für andere Vertreter der GR-Familie beschrieben ist. Dort findet sich im C-terminalen Bereich ein  $\beta\beta\alpha\alpha$  Motiv (Abb. 5.18, S. 40), welches die nicht-kovalente Bindung der Untereinheiten vermittelt. Diese Dimerisierungsdomäne kann bei FCC und SQR schon alleine deswegen nicht gefunden werden, weil die Primärsequenzen im Vergleich zu GR und LipDH C-terminal



verkürzt sind (vgl. Abb. 5.14. D pyr\_redox\_dim Motiv, S. 34). Aus der Kristallstruktur des FCC ist dessen Dimerisierungsbereich bekannt. Er befindet sich dort im Bereich zwischen den Motiven Nr. 3 und Nr. 4 (Tab. 5.1., S. 35). In diesem Bereich finden sich zwar identische Aminosäurepositionen und hohe Homologien zwischen FCC und SQR, aber nur wenig Ähnlichkeit der beiden zu GR oder LipDH (Abb. 5.16., S. 39). Biochemische Untersuchungen C-terminal verkürzter SQR-Proteine (Schütz et al., 1997) und C-terminal durch Histidin-Tag erweiterter Proteine (Griesbeck, 1998) weisen auf eine mechanistische Rolle dieses Teils des Proteins hin. Für den Fall der Erweiterung um 10 Histidine sank die spezifische Aktivität, für den Fall der Verkürzung um 25 Aminosäurereste war keinerlei SQR-Aktivität mehr messbar. Ob es sich dabei aber um Phänomene handelt die durch Unterschiede in der Dimerbildung vermittelt werden, kann auf Basis der durchgeführten Experimente nicht entschieden werden. Der hier diskutierte Vergleich von Dimerisierungsdomänen basierend auf der FCC Struktur legt den Schluss nahe, dass der C-terminale Bereich der SQR für deren Dimerisierung keine Rolle spielt.

Die große Ähnlichkeit der Sequenzen von FCC und SQR im N-terminalen Bereich deuten darauf hin, dass sich hier auch in der Struktur der SQR das als „Rossmann fold“ bezeichnete Faltungsmuster befindet. Die für die ersten 100 Aminosäuren der *A. aeolicus* SQR-Sequenz vorhergesagten Anteile für Sekundärstrukturelemente decken sich mit den Anteilen der aus der Kristallstruktur bekannten Muster des FCC (Abb. 5.15. 3. und 4. Zeile, S. 36). Dieser stark konservierte Bereich vermittelt die Bindung der Adeninuntereinheit des gestreckten FAD-Moleküls (Dym & Eisenberg, 2001). Ferner ist auch für den Bereich der Bindung der Elektronenakzeptoren (Cytochrom *c* bei FCC bzw. Chinon bei SQR) ein Unterschied der Struktur von FCC und SQR zu erwarten. Untersuchungen an einem für Chinonbindung in Frage kommenden Bereich der SQR, zeigten keinen Einfluss auf die Affinitätswerte gegenüber dUQ (Griesbeck, 2001). Insofern ist der Chinonbindungsbereich der SQR noch nicht bekannt, und wird höchstwahrscheinlich auch nicht durch Sequenzvergleiche identifizierbar sein. Letztendlich kann nur die Aufklärung der Kristallstruktur zur Klärung einer Vielzahl noch offener Fragen beitragen, und vielversprechende Kandidaten von Aminosäurepositionen für weitere Mutationsexperimente liefern.

## 7. Ausblick

Die sulfidabhängige Chinonreduktion ist eine verbreitete Form sulfidotrophen Wachstums, welche bei photosynthetischen Prokaryoten wie der fädigen Blaualge *Oscillatoria limnetica* (Shahak et al., 1987), der einzelligen Blaualge *Aphanothece halophytica* (Bronstein et al., 2000) und dem  $\alpha$ -Proteobakterium *Rhodobacter capsulatus* (Schütz et al., 1998a) bekannt ist. Auch fakultativ chemoautotrophe Organismen wie *Paracoccus denitrificans* (Schütz et al., 1998b) und obligat chemoautotrophe wie *Aquifex aeolicus* (Huber et al., 1992) zeigen sulfidabhängiges Wachstum (Für eine Übersicht siehe Griesbeck et al., 2000). SQR-Aktivität und das Vorhandensein von Genen, welche Proteine mit zum Teil hoher Homologie zu charakterisierten SQR-Proteinen kodieren, ist aber nicht auf das Reich der Bakterien beschränkt. Auch in Archaeen und Eukaryoten ist sulfidabhängige Chinonreduktion nachgewiesen worden, und im Rahmen der Genomsequenzierungsprojekte sind viele weitere SQR-homologe Proteine gefunden worden (Theissen et al., 2003). Mit Ausnahme des HMT2 Proteins aus *S. pombe* (Vande Weghe & Ow, 1999) liegen aber für eukaryotische SQR-Homologe keine biochemischen Studien an isolierten Proteinen vor. Das HMT2-Protein katalysiert zwar *in vitro* die Chinonreduktion durch Sulfid, aber eine physiologische Bedeutung beim sulfidabhängigen Wachstum ist hier wie für viele andere Organismen (*C. elegans*, *D. melanogaster*, *M. musculus* und *H. sapiens*) eher unwahrscheinlich. Die Umweltbedingungen vor über zwei Milliarden Jahren und die phylogenetisch weite Verbreitung der SQR bzw. deren Homologer deuten auf eine zeitgeschichtlich frühe Entstehung hin (Theissen et al., 2003). Dennoch kann erst die Aufklärung des Reaktionsmechanismus Klarheit darüber bringen, ob in allen drei Domänen des Lebens sulfidabhängige Chinonreduktion auf den gleichen Prinzipien beruht.

Ausgangspunkt für die Charakterisierung der *A. aeolicus* SQR, war die Suche nach einem für eine biotechnologische Anwendung als Sulfidsensor besser geeigneten Enzym (Schödl, 2000). Das nun verfügbare Enzym aus dem hyperthermophilen Bakterium *A. aeolicus* sollte sich in Bezug auf seine Stabilität hierfür besser eignen als das aus *R. capsulatus* isolierte und für diesen Zweck schon untersuchte Protein (ebd.). Für eine Anwendung als Sulfidsensor sollte in zukünftigen Experimenten die SQR aus *A. aeolicus* bezüglich ihrer Langzeitstabilität bei Raumtemperatur und unter Belichtung untersucht werden.

Die von Griesbeck et al. (2002) durchgeführten Mutationsexperimente an der SQR aus *R. capsulatus* und der daraus abgeleitete Vorschlag für einen Reaktionsmechanismus konnten einen ersten wichtigen Beitrag zur Klärung der molekularen Abläufe im Protein liefern. Weitere Einblicke in den Mechanismus der katalysierten Redoxreaktion dürften spektroelektrochemische Mittelpunktspotentialbestimmungen der Cysteinmutationen und der

---

Valinmutation des SQR-Proteins liefern (Griesbeck, 2001). Auch die spektroskopische Beschreibung der Cysteinmutationen mit hoher zeitlicher Auflösung sollte weitere Anhaltspunkte für den vorgeschlagenen Mechanismus liefern können. Für ein umfassendes Verständnis wäre die Klärung der dreidimensionalen Struktur durch Röntgenkristallographie sehr hilfreich, wenn nicht sogar absolut nötig. Da sich oftmals thermostabile Proteine besser zur Kristallisation eignen als deren mesophile Homologe, bleibt zu hoffen, dass die im Rahmen dieser Arbeit begonnene Zusammenarbeit mit Dr. R. Lancaster (MPI für Biophysik, Frankfurt) zur Lösung der Tertiärstruktur führen wird.

## 8. Material und Methoden

### 8.1. Material

#### 8.1.1. Organismen

*Escherichia coli*:

Stamm	Genotyp	Quelle
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , ompT, hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), gal, dcm (DE3)	Studier et al., 1990
DH10B	mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80d, lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ(ara, leu)7697, galU, galK, rspL, nupG{p3:Km, amber amp, amber tet}	Grant et al., 1990
JM109	endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), relA1, supE44, λ <sup>-</sup> , Δ(lac-proAB), [F', traD36, proA+B+, lacI <sup>f</sup> ZΔM15]	Promega, Mannheim, Deutschland

*Saccharomyces cerevisiae*:

Stamm	Genotyp	Quelle
K699 (W303)	MATa ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3 leu2-112 can1-100	ATCC No.208352 American Type Culture Collection, Manassas,USA

*Aquifex aeolicus*:

Stamm	Genotyp	Quelle
VF 5	Wildtyp	Deckert et al., 1998

#### 8.1.2. Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Quelle
pUC18	Amp <sup>r</sup> , Klonierungsvektor	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
pET17b	Amp <sup>r</sup> , Expressionsvektor	Novagen Seed, 1987
pET11a	Amp <sup>r</sup> , Expressionsvektor	Stratagene, La Jolla, USA
pMAL-c2X	Amp <sup>r</sup> , malE, Expressionsvektor	New England Biolabs, Frankfurt/M, Deutschland
pTAHSQR	Amp <sup>r</sup> , sqr,	Schödl, 2000
pYES2	GAL1, T7, CYC1, pMB1, Amp <sup>r</sup> , URA3, 2μ, f1	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

pYES2-sqr	<i>GAL1</i> , T7, <i>CYC1</i> , pMB1, Amp <sup>r</sup> , <i>URA3</i> , 2 $\mu$ , f1, <i>sqr</i> ,	diese Arbeit
pMAL-casqr	Amp <sup>r</sup> , <i>casqr</i> ,	diese Arbeit
pET11a-casqr	Amp <sup>r</sup> , <i>casqr</i> ,	diese Arbeit
pET11a-casqr2	Amp <sup>r</sup> , <i>casqr</i> ( $\Delta$ H <sub>6</sub> D <sub>4</sub> K)	diese Arbeit

### 8.1.3. Chemikalien

Agarose	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Antibiotika	Ampicilin Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
D-Aminosäure-Oxidase	Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland)
dUQ, Menadion	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Detergentien	Thesit: Boehringer (Mannheim, Deutschland) Dodecylmaltosid: Glycon (Luckenwalde, Deutschland)
Enzyme für molekularbiologisches Arbeiten	New England Biolabs (Beverly, USA) Stratagene (La Jolla, USA) Promega (Madison, USA)
Mediatoren für Redoxtitration	2-OH-1,4-Naphtochinon: Eastman, USA HDBT Gemisch (Griesbeck, 2001)
Kulturmedien	USB (Cleveland, Ohio, USA) Difco (Detroit, USA)
Oligonukleotide	Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland) MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland)

### 8.1.4. Medien

#### 8.1.4.1. Luria Broth Medium

Für LB Medium wurden ein Liter Wasser mit 10 g Bacto Trypton, 5 g Yeast Extract und 5 g NaCl versetzt. Für Agarplatten wurden zu dieser Mischung 15 g Agar gegeben (Maniatis et al., 1989).

#### 8.1.4.2. YPD Vollmedium

Für YPD-Medium wurde ein Liter Wasser mit 10 g Bacto Yeast Extrakt, 20 g Bacto Pepton und 20 g D-Glucose versetzt. Für Agarplatten wurden zu dieser Mischung 15 g Agar gegeben.

#### 8.1.4.3. Hefe Minimalmedium (drop out URA)

Für 1 l Minimalmedium wurde 6,7 g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 20 g Glucose und 0,77 g CSM-URA (Rutherford, Kalifornien, USA) in einem Liter Wasser gelöst.

#### 8.1.5. Antibiotika

Antibiotika wurden steril filtriert, Zugabe erfolgte nach dem Autoklavieren des Mediums. Ampicilin wurde in einer Arbeitskonzentrationen von 50 µg/µl verwendet:

## 8.2. Molekularbiologische Methoden

### 8.2.1. Standardmethoden

#### 8.2.1.1. Plasmidisolierung, Restriktionsverdau

Plasmid-DNA wurde dem Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Restriktionsverdau, Ligationen und Agarose-Gele wurden gemäß Maniatis et al. (1989) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben durchgeführt. Über Agarosegele aufgetrennte DNA wurde mit NucleoSpin-Extraction-Gelex (Machery und Nagel, Oensingen, Schweiz) gemäß Herstellerprotokoll extrahiert.

#### 8.2.1.2. CaCl<sub>2</sub>-Transformation von *E. coli*

(Basierend auf Cohen et al., 1972)

##### *Herstellung kompetenter Zellen*

50 ml LB-Medium wurden mit einer frischen ÜN-Kultur in einer Verdünnung von 1:100 angeimpft und im Luftschüttler bei 37°C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (SS34, 500 rpm, 5 min, 4°C ) und vorsichtig in 40-50 ml eiskaltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis für 30 min wurden die Zellen pelletiert (SS34, 2500 rpm, 5 min, 4°C ). Ein ringförmiges Pellet ist Zeichen für eine erfolgreiche Prozedur. Die Zellen wurden in 5 ml 0,1 M eiskaltem CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und für 2 h auf Eis inkubiert. Danach wurden sie transformiert oder portioniert in flüssigem Stickstoff, für die Aufbewahrung bei -70°C, eingefroren.

##### *Transformation*

200 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit der Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden sie für 2 min bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und noch einmal 2 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden mit 1 ml LB-Medium versetzt, 1 h bei 37°C geschüttelt und auf LB-Platten ausplattiert.

#### 8.2.1.3. Elektroporation von *S. cerevisiae*

500 ml einer YPD-Kultur wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 0,7 - 1,5 durch Zentrifugation bei 4000 g und 4°C für 5 min geerntet. Das Zellpellet wurde in 1 Vol. eiskaltem, sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit ½ Vol. eiskaltem, sterilem H<sub>2</sub>O und mit 1/25 Vol. eiskaltem 1 M Sorbitol wiederholt. Das Pellet wurde in 1/1000 Vol. eiskaltem 1 M Sorbitol aufgenommen. Ein Aliquot von 40 µl wurde mit 5 µl Plasmid-DNA vermischt und elektroporiert (0,2 cm Küvetten; 1,5 kV; 25 µF; 200 Ω). Zu dem Ansatz wurde 1 ml kaltes 1 M Sorbitol gegeben, gemischt und auf Selektionsmedium ausplattiert.

#### 8.2.1.4. Herstellung von Glycerinkulturen

500 µl einer frischen ÜN-Kultur wurden mit dem gleichen Volumen 87 % (v/v) autoklavierten Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -70°C.

#### 8.2.1.5. Polymerase-Ketten-Reaktion PCR

Die eingesetzte Menge an Template-DNA betrug standardmäßig 100 ng. Zur Optimierung der Reaktion wurden unter Umständen davon abweichende Mengen eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt neben der Template-DNA je 100 pmol Oligonukleotide und wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 µl gebracht. Nach Zugabe von 25 µl Eppendorf Master Mix wurde die Reaktion gestartet. Die Annealingtemperatur wurde in der Regel 5°C niedriger als die Schmelztemperatur des bindenden Bereichs des Oligonukleotids gewählt. Standardmäßig wurden 30 Reaktionszyklen durchgeführt, und die Reaktionsprodukte auf Agarosegelen analysiert.

### 8.2.2. Gensynthese

Als Methode zur Synthese von Polynukleotiden aus Oligonukleotidbausteinen wurde die von P. Hegemann und W. Oertel entwickelte Methode gewählt (Fuhrmann et al., 1999). Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind gesondert im Teil 9.2 (S. 74) aufgeführt.

Das *sqr*-Gen wurde im 5'-Bereich um einen Polyhistidin-Tag mit Enterokinase-Schnittstelle ergänzt und für die Gensynthese in drei Fragmente aufgeteilt (vgl. Abb. 5.2., S. 18).

Fragment 1	0-459	459bp
Fragment 2	389-900	511bp
Fragment 3	834-1343	509bp

#### 8.2.2.1. 5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Es wurden wie folgt Mischungen von je 10 µl einer 50 pmol/µl Lösung der Oligonukleotide (Sequenzen siehe Seite 74) hergestellt:

Mix1forw:	f02, f03, f04, f05, f06, f07, f08, f09, f10, f11
Mix2forw:	f11, f12, f13, f14, f15, f16, f17, f18, f19, f20
Mix3forw:	f21, f22, f23, f24, f25, f26, f27, f28, f29, f30

Zur Reaktion wurden 10 µl der äquimolaren Lösungen, 10 µl 10x Kinase Puffer, 10 µl 2 mM ATP, 69 µl Wasser und 1 µl Polynukleotidkinase (10.000 U/ml) bei 37°C für 4 h inkubiert. Nach Ende der Reaktion wurde die Lösung für 5 Minuten auf 95°C erhitzt.

#### 8.2.2.2. Ligations-Ketten-Reaktion LCR

Es wurden wie folgt Mischungen von je 10 µl einer 50 pmol/µl Lösung der Oligonukleotide (Sequenzen siehe Seite 74) hergestellt:

Mix1rev:	f01, r01, r02, r03, r04, r05, r06, r07, r08, r09, r10
Mix2rev:	f10, r11, r12, r13, r14, r15, r16, r17, r18, r19
Mix3rev:	f20, r21, r22, r23, r24, r25, r26, r27, r28, r29

Zur Reaktion wurden 10 µl Mix1forw (bzw. Mix1Cforw, Mix2forw und Mix3forw) nach 5'-Phosphorylierung mit 10 µl Mix1rev (bzw. Mix1Crev, Mix2rev und Mix3rev) gemischt und mit 3 µl 10x Reaktionspuffer sowie 3 µl einer 10 mM ATP-Lösung versetzt und mit H<sub>2</sub>O auf 97 µl Gesamtvolumen gebracht. Diese Lösung wurde für 3 Minuten auf 95°C sowie anschließend für 3 Minuten auf 80°C erhitzt. Danach erfolgte der Zusatz von 3 µl *Pfu* DNA Ligase. Die Ligationskettenreaktion wurde im Thermocycler wie folgt durchgeführt:

3 Zyklen	95°C, 1 Minute
	70°C, 1 Minute
	lineare Abkühlung auf 55°C innerhalb einer Stunde
	55°C, 2 Stunden

Die Reaktionsprodukte wurden auf das 50-fache verdünnt und als Template für PCR-Reaktionen mit geeigneten Primern verwendet.



### 8.2.3. Heterologe Expression in *E. coli*

Für die Expression wurden zwei Liter LB Medium mit einer frischen ÜN Kultur in einer Verdünnung von 1:100 angeimpft und im 37°C-Schüttler inkubiert. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,5 bis 0,8 wurde IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugegeben. Die Zellen wurden in einer Heraeus Variofuge 3 (Heraeus, Hanau, Deutschland) für 10 min bei 4000 rpm pelletiert und zum Waschen in einem Zehntel des ursprünglichen Volumens in Puffer (50 mM BisTris, pH 6,5, 2 mM  $MgCl_2$ ) aufgenommen. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in wenig Puffer aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren bzw. für die Isolierung der SQR aufgeschlossen.

### 8.2.4. Heterologe Expression in *S. cerevisiae*

In Minimalmedium gewachsene Hefe-Übernachtskultur wurde durch Zentrifugation geerntet, mit 10 ml sterilem Wasser gewaschen und in 200 ml Minimalmedium auf eine  $OD_{600} = 0,1$  eingestellt. Das Minimalmedium enthielt zur Induktion der Proteinbiosynthese 2% (w/v) Galactose und 1% (w/v) Raffinose. Nach etwa 16 Stunden wurden die Hefezellkulturen bei einer  $OD_{600} = 0,8-1,0$  geerntet. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in wenig Puffer aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren bzw. für die Isolierung der SQR mit der Glasperlenmethode aufgeschlossen.

## 8.3. Biochemische Methoden

### 8.3.1. Bestimmung der Sulfidkonzentration in wässrigen Lösungen

In dem von Pachmayr (1960) beschriebenen Test (modifiziert nach Trüper & Schlegel, 1964) reagiert N,N-Dimethyl-p-phenylen-diamin-dihydrochlorid in saurer Lösung mit Eisen(III)-sulfat als Katalysator zunächst zu dem Intermediat Indammoniumsalz (Bindschedler's Grün), welches dann mit  $H_2S$  zu Methylenblau kondensiert. Das gebildete Methylenblau absorbiert bei einer Wellenlänge von 670 nm und ermöglicht dadurch eine quantitative Bestimmung von  $H_2S$ . Durch Vergleich der Absorption mit einer Eichgeraden kann der Sulfidgehalt einer Probe ermittelt werden. Die Eichgerade wurde durch Vermessung von Proben mit definiertem Sulfidgehalt, der durch anorganische Titration gemessen wurde, erstellt. In saurem Medium reagiert Sulfid in Gegenwart von Sauerstoff zu elementarem Schwefel, außerdem ist es leicht flüchtig. Um diesen Verlust zu vermeiden, wird die Probe unmittelbar nach Entnahme zu einer Lösung von Zinkacetat gegeben, so dass das Sulfid als Zinksulfid ausgefällt wurde.

Zur Sulfidbestimmung wurden 500  $\mu$ l 2% (w/v) Zinkacetat vorgelegt und dazu wurden 790  $\mu$ l der zu bestimmenden Lösung (bzw. eine Verdünnung in entgasten  $H_2O$ ) gegeben. Das

ausgefällte Zinksulfid kann mehrere Stunden im Dunkeln aufbewahrt werden. Für die Reaktion wurden 200 µl N,N-Dimethyl-p-phenylen-diamindihydrochlorid und 10 µl 10% (w/v) Ammoniumeisen(III)-sulfat in 2% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugegeben. Nach 20 min im Dunkeln wurde die OD<sub>670</sub> bestimmt, und die Sulfidkonzentration mit Hilfe der Eichgeraden ermittelt.

### 8.3.2. Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

Induzierte *E. coli*-Zellen wurden mit einer Spatelspitze DNase versetzt und im Potter homogenisiert. Zellaufschluss erfolgte durch dreimalige French Press Behandlung unter ständiger Kühlung. Durch Zentrifugation (SS34, 7500 rpm, 20 min) wurden nicht-aufgebrochene Zellen und Zelltrümmer abgetrennt. Aus dem Überstand wurde die Membranfraktion durch Ultrazentrifugation (Ti60, 45000 rpm, 1 h) sedimentiert. Diese Fraktion wurde in 50 mM BisTris/HCl, pH 6,5, 2 mM MgCl<sub>2</sub> zweimal gewaschen, gepottert und zentrifugiert. Danach wurde das Pellet im Puffer ohne MgCl<sub>2</sub> resuspendiert.

Solubilisierung erfolgte mit Detergenz (Thesit oder Dodecylmaltosid, beide 0,6% (w/v) unter ständigem Rühren für mindestens eine Stunde auf Eis. Alternativ wurde die Solubilisierung mit NaBr durchgeführt. Hierzu wurde nach Zugabe auf 2 M NaBr zur Lösung selbige unter Rühren mit Puffer (s.o. ohne MgCl<sub>2</sub>) auf 1 M NaBr verdünnt. Nach der Solubilisierung erfolgte die Sedimentation durch Ultrazentrifugation. Der Überstand wurde zur weiteren Reinigung einer der folgenden Methoden zugeführt.

#### 8.3.2.1. Affinitätschromatographie mit Ni<sup>2+</sup>-NTA Matrix

Das Solubilisat wurde über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA Matrix der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben chromatographiert. Als Affinitätschromatographiepuffer diente 50 mM Na-Phosphat, pH 6,0, 300 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, dem 0,025% (w/v) des im Solubilisat enthaltenen Detergenz zugesetzt wurden. Die Elution erfolgte mit von 50 bis 400 mM ansteigender Imidazol-Konzentration im Puffer. Die Fraktionen wurden mit SDS-PAGE analysiert und zweckmäßig vereinigt.

#### 8.3.2.2. Hitzedenaturierung

Aus dem Solubilisat konnten nicht thermostabile Proteine durch Hitzedenaturierung ausgefällt werden. Dazu wurde das Solubilisat in 2 ml Eppendorf-Cups portioniert und im Tischinkubator unter intensivem Schütteln für 20 min bei 80°C inkubiert. Die denaturierten Proteine wurden in der Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit vom Solubilisat getrennt, und das Solubilisat wurde zur Abtrennung weiterer Verunreinigungen nochmals zentrifugiert (Ti60, 45000 rpm, 1 h).

### 8.3.2.3. Endreinigung und Konzentration

Zur Abtrennung niedermolekularer Substanzen wurden die gereinigten Solubilisate gegen 50 mM BisTris, pH 6,5, 0,025% (w/v) des im Solubilisat enthaltenen Detergenz bei 4°C übernacht im Dunkeln dialysiert.

Im letzten Schritt wurden die Proben mit Proteinkonzentratoren der Firma Pall Filtron (Northborough, USA) aufkonzentriert.

### 8.3.3. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes wurde mit dem BCA (Bicinchoninic Acid) Test der Firma Pierce (Rochford, USA) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Er basiert auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  durch Cystein-, Cystin-, Tryptophan- und Tyrosin-Reste im alkalischen Medium. Die entstehenden  $\text{Cu}^+$  Ionen bilden mit BCA einen wasserlöslichen Komplex, dessen Konzentration durch Absorptionsspektroskopie bei 562 nm bestimmt werden kann. Die Eichgerade wurde mit BSA-Proteinstandardlösungen erstellt.

### 8.3.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS-PAGE wurde nach Laemmli, 1970 in Bio-RAD Minigel-Apparaturen (Bio-RAD; Hercules, USA) durchgeführt. Der Probenpuffer enthielt 375 mM Tris/HCl (pH 6,8), 12% (w/v) SDS, 25% (v/v) Glycerin, 30% EtSH und 0,6% Bromphenolblau. Die Gele wurden mit Coomassie (Cabral & Schatz, 1979) oder Silber (ICN-Rapid-Ag-Stain, ICN, Irving, USA) gefärbt.

### 8.3.5. Western-Blot Analyse

Der Transfer der Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Immobilon™ Membranen (Immobilon-P-PVDF, Millipore, Eschborn, Deutschland) erfolgte mittels einer Bio-RAD Miniblottcell (Bio-RAD, Hercules, USA) bei 200 mA für 20 min unter ständiger Kühlung.

Der primäre His-Tag Antikörper wurde von der Firma Santa Cruz (Santa Cruz, Kalifornien, USA) bezogen und in einer 1:333 Verdünnung (Ausgangskonzentration 200 µg/ml) verwendet. Nach Reinigung und Reaktion mit dem sekundären Antikörper wurde zum Nachweis der Proteine der Chemolumineszenz-Kit der Firma Boehringer (Mannheim, Deutschland) verwendet. Zur Visualisierung der Banden wurden photographische Filme der Firma AGFA (Köln, Deutschland) verwendet.

### 8.3.6. Bestimmung des FAD-Gehalts

Der von Rao et al. (1967) entwickelte und von Griesbeck (2001) modifizierte Test zur quantitativen Bestimmung des FAD basiert auf der Rekonstitution des D-Aminosäure-Oxidase-Apoproteins. D-Aminosäure-Oxidase (D-AOX) katalysiert die Oxidation von D-Aminosäuren zur entsprechenden  $\alpha$ -Ketosäure. Aus dem Flavoprotein D-AOX kann die prosthetische Gruppe FAD leicht extrahiert werden. Bei Zugabe von kleinen Mengen FAD zum isolierten Apoprotein erhält man rekonstituiertes Holoenzym, dessen Aktivität in einem Enzymtest als  $O_2$ -Verbrauch bestimmt werden kann. Durch Zugabe von bekannten Mengen FAD kann eine Eichgerade erstellt werden, aus der dann der FAD-Gehalt einer unbekannt Probe abzulesen ist.

#### 8.3.6.1. Extraktion des FAD aus D-Aminosäure-Oxidase

Zur Isolierung des D-AOX-Apoproteins wurden zu 1 ml D-AOX-Holoenzym (5 mg/ml), 1 ml  $H_2O$ , 0,7 ml  $(NH_4)_2SO_4$  (gesättigt) und 0,8 ml 0,1 N HCl gegeben. Nach Zentrifugation (SS34, 10000 rpm, 10 min) wurde das Pellet in 2 ml 10 mM K-Phosphat, pH 7,0 aufgenommen. Diese Extraktion mit anschließender Zentrifugation wurde noch zweimal wiederholt. Schließlich wurde das Pellet in 2 ml 0,2 M K-Phosphat, pH 7,0 aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Das im Überstand befindliche Apoprotein konnte anschließend in den FAD-Test eingesetzt werden.

#### 8.3.6.2. Extraktion des FAD aus SQR

##### *H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Denaturierung*

Die Extraktion des FAD aus SQR erfolgte mit der „H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Methode“ (Engels et al., 1997). Dazu wurde zur SQR-Lösung  $\frac{1}{10}$  Volumen 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde das denaturierte Protein 10 min in der Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert. Danach wurde der Überstand mit  $\frac{1}{5}$  Volumen 1 N NaOH neutralisiert.

##### *Pronase-Verdau*

Unter Verwendung der unspezifischen Protease sollte der nicht kovalent gebundene Chromophor durch proteolytischen Verdau des SQR-Enzyms freigesetzt werden. Der Versuch wurde mit Pronase (Roche, Mannheim, Deutschland) gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

### 8.3.6.3. Rekonstitution der D-AOX und FAD-Bestimmung

Zur enzymatischen Bestimmung der D-AOX-Aktivität nach FAD-Zugabe wurde in eine Sauerstoffelektrodenkammer folgender Ansatz vorgelegt:

500 µl 0,1 M Tricin/NaOH, pH 8,0

300 µl 0,1 M D-Alanin

10 µl D-AOX-Apoprotein

ad 3 ml H<sub>2</sub>O

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 bis 100 µl einer FAD-Probe gestartet. Die Rate des Sauerstoffverbrauchs durch Oxidation des D-Alanins zu Pyruvat durch D-AOX erfolgt proportional zur Menge des zugegebenen FAD ( $\text{D-Ala} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Pyruvat} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ ), sofern FAD limitierend ist (d.h. in geringerer Menge als das D-AOX-Apoprotein vorliegt). Eine Eichgerade wurde mit 10 bis 100 µl einer 1 µM FAD-Lösung erstellt.

### 8.3.7. Bestimmung der SQR-Aktivität

Die SQR-Aktivität wurde photometrisch über die sulfidabhängige Reduktion von Chinon ermittelt Shahak et al. (1994) bestimmt. Die Messungen erfolgten in einem Diodenarray-Spektrophotometer Specord S100B (Analytik Jena, Jena Deutschland). Um eine Verfälschung der Messwerte durch sauerstoffabhängige Sulfidoxidation, Sulfidausgasung oder Chinol-Rückoxidation zu verhindern, wurden zur Messung N<sub>2</sub> begaste Geräte und Puffer verwendet. Der 2 ml Messansatz enthielt neben dem SQR-Protein 50 mM BisTris (pH 6,5), 40 µM dUQ und zur Sauerstoffeliminierung 50 mM Glucose, 10 µg Glucose-Oxidase und 10 µg Katalase.

Für Decylubichinon (dUQ) kann der Übergang vom oxidierten Chinon zum reduzierten Chinol anhand der Abnahme des Absorptionsmaximums bei 275 nm gemessen werden (isosbestischer Punkt für diesen Übergang bei 300 nm). Als Differenzextinktionskoeffizient  $\epsilon_{275-300}$  für den Übergang wurde 12,5 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> ermittelt (Griesbeck, 2001).

Bei Menadion kann der Übergang vom oxidierten in den reduzierten Zustand bei 260 nm gegen 280 nm gemessen werden. Als Differenzextinktionskoeffizient wurde 7,8 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> verwendet (Lemma et al., 1990 sowie eigene Messungen).

Die Messung wurde durch Zugabe von > 40µM Na<sub>2</sub>S gestartet. Durch Ermittlung der Anfangssteigung wurde die Aktivität ermittelt:

$$\frac{n(\text{QH}_2)}{t}; \quad \text{Einheit: } 1\text{U} = \frac{1\mu\text{mol}(\text{QH}_2)}{\text{min}};$$

Die Aktivität U gibt die Stoffmenge Chinon (µmol) an, welche pro Zeiteinheit (min) reduziert wird. Auf die Proteinmenge bezogen ergibt sich die spezifische Aktivität in U/mg Protein.

Zur Messung der pH-Abhängigkeit der SQR-Reaktion wurde in ein Gemisch aus sechs pH-Puffersubstanzen gewählt: je 20 mM MES (pK<sub>a</sub> 6,1), BisTris (pK<sub>a</sub> 6,5), MOPS (pK<sub>a</sub> 7,2), HEPES (pK<sub>a</sub> 7,5), Tricine (pK<sub>a</sub> 8,1) und AMPSO (pK<sub>a</sub> 9,0). Der gewünschte pH Wert wurde mit HCl bzw. NaOH eingestellt.

### 8.3.8. Redox Titration

(nach Dutton, 1978)

Die Bestimmung des elektrochemischen Mittelpunktspotentials des Flavins der SQR erfolgte spektrophotometrisch in einem Diodenarrayphotometer (Specord S100B, Analytik Jena, Jena, Deutschland). Hierzu wurde das Absorptionsspektrum der SQR in Abhängigkeit des chemisch eingestellten Redoxpotentials gemessen. Unter anaeroben Bedingungen wurde durch Zugabe von Dithionit (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) das Potential zu negativeren und durch Zugabe von Ferricyanid (K<sub>3</sub>[Fe<sup>III</sup>(CN)<sub>6</sub>]) zu positiveren Werten verschoben. Das aktuelle Potential wurde mit einer Redox-Einstabmesskette (Mettler Toledo Pt4800-M5, Mettler Toledo, Columbus, USA) bestimmt. Die Eichung der Redoxelektrode erfolgte mit drei Lösungen bekannten Potentials. Die Konzentrationen der Salzlösungen wurden durch Einwage voreingestellt und durch Absorptionmessungen mit anschließender Verdünnung exakt eingestellt.

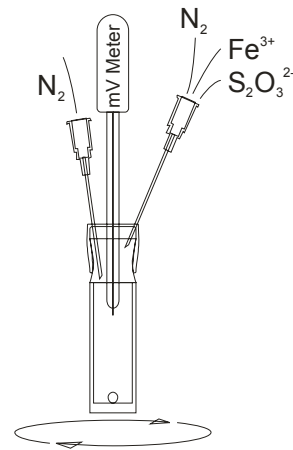
	$\varepsilon$ [mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
K <sub>3</sub> [Fe <sup>III</sup> (CN) <sub>6</sub> ]	23,500 bei $\lambda_{217}$ , 0,225 bei $\lambda_{330}$
K <sub>4</sub> [Fe <sup>II</sup> (CN) <sub>6</sub> ]	1,300 bei $\lambda_{260}$ , 1,050 bei $\lambda_{420}$

Werte aus Sadtler, S.P. (1961), The Sadtler, Coblenz Society Spectra, 1517 Vine Street, Philadelphia, Pennsylvania

Lösung		Potential
K <sub>3</sub> [Fe <sup>III</sup> (CN) <sub>6</sub> ] : K <sub>4</sub> [Fe <sup>II</sup> (CN) <sub>6</sub> ] =	1:1	+430 mV
K <sub>3</sub> [Fe <sup>III</sup> (CN) <sub>6</sub> ] : K <sub>4</sub> [Fe <sup>II</sup> (CN) <sub>6</sub> ] =	10:1	+489 mV
K <sub>3</sub> [Fe <sup>III</sup> (CN) <sub>6</sub> ] : K <sub>4</sub> [Fe <sup>II</sup> (CN) <sub>6</sub> ] =	1:10	+371 mV

Da das FAD durch die Proteinumgebung stark abgeschirmt ist, wurden chinoide Redoxmediatoren zugesetzt (Dutton, 1978). Es wurde die von Griesbeck (2001) beschriebene Kombination unten angegebener Mediatoren gewählt. Dementsprechend enthielt ein Versuchsansatz (3 ml):

- 200 mM Tris/HCl, pH 7,0
- 1 mg/ml SQR
- 0,025% Detergenz
- 7  $\mu\text{M}$  2-Hydroxy-1,4-Naphtochinon (-145 mV)
- 5  $\mu\text{M}$  HDBT-Gemisch (-40 mV)  
(siehe Griesbeck, 2001)
- 7  $\mu\text{M}$  Menadion ( 0 mV)
- 13  $\mu\text{M}$  1,4-Naphtochinon (+60 mV)
- 13  $\mu\text{M}$  1,2-Naphtochinon (+145 mV)



**Abb. 8.1.**  
**Experimenteller**  
**Aufbau**

Eine mit Gummistopfen verschlossene Küvette. Der Gummistopfen ist mit zwei Kanülen und der Redoxeinstabmesskette durchbohrt. Durch die linke Kanüle wurde mit  $\text{N}_2$  begast, durch die rechte konnte  $\text{N}_2$  entweichen und  $\text{Fe}^{3+}$  bzw. Dithionitlösung zugegeben werden

Spektren wurden in Schritten von ca. 10 mV aufgenommen, wenn für mindestens 5 min ein konstantes Potential angezeigt wurde. Das Absorptionsspektrum wurde im Bereich von 300 bis 700 nm aufgenommen. Zur Auswertung wurden Differenzspektren berechnet, wobei jeweils das Spektrum des niedrigsten Potentials abgezogen wurde.

### 8.3.9. Fluoreszenzspektroskopie

Die Messungen wurden mit einem Shimadzu RF-5301 PC-Fluorimeter (Shimadzu, Japan) durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, waren die Meßlösungen aerob, die Küvette wurde durch ein Thermostat bei einer Temperatur von 20°C gehalten. Die Messung erfolgte in einer Pufferlösung 50 mM BisTris/HCl bei einem pH-Wert von 6,5.

## **8.4. Computergestützte Methoden**

### **8.4.1. Übersetzung von Proteinsequenzen in DNA Sequenzen**

Hierzu wurde das *backtranslate* Programm der Firma Entelechon (Regensburg, Deutschland) verwendet. Es ist nach Registrierung unter <http://www.entelechon.de/> frei verfügbar.

### **8.4.2. Proteinsequenzvergleiche**

Zum Vergleich der Sequenzen von Proteinen wurde das im Internet frei verfügbare T-COFFEE Programm (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>, Notredame et al., 2000) verwendet.

### **8.4.3. Proteindomänenvergleiche (CDD)**

Zur Analyse von Aminosäuresequenzen auf das Vorhandensein bekannter Proteindomänen wurde das Programm CDD (Conserved Domain Database, NCBI, <http://www.ncbi.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) verwendet.

### **8.4.4. Darstellung dreidimensionaler Proteinstrukturen**

Zur Darstellung von pdb-Dateien wurde das VMD-Programm (VMD Visual Molecular Dynamics, Universität von Illinois, USA, <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) und das spdbv-Programm (Guex & Peitsch, 1997, <http://www.expasy.org/spdbv/>) verwendet.



## 9. Appendix

### 9.1. DNA-Sequenz des synthetischen *sqr*-Gens (*casqr*)

Ausgehend von der DNA-Sequenz des SQR-Proteins aus *A. aeolicus* (Acc. No. NP\_214500) wurde die Aminosäuresequenz mit dem Programm *backtranslate* (vgl. Kap. 8.4.1, S. 72) in eine an den Codon-Gebrauch von *E. coli* adaptierte DNA-Sequenz übersetzt. Anschließend wurden unter Erhaltung des Leserahmens und der Aminosäuresequenz Restriktionsschnittstellen und Codons für Histidin-Tag und Enterokinase-Schnittstelle eingefügt.

Die Sequenz des *casqr*-Gens (ohne Histidin-Tag und Enterokinase-Schnittstelle) wurde in die NCBI-Genbank eingetragen (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/index.html>) und ist unter der „Accession number“ AY340667 verfügbar.

1-6 **EcoRI**  
 7-9 **ATG** Start Codon  
 10-27 6x Histidin Tag  
 28-42 Enterokinase-Schnittstelle DDDDK  
 43 **Beginn** des *casqr*-Gens (ohne ATG)  
 420 **Restriktionsschnittstelle SphI**  
 868 **Restriktionsschnittstelle HpaI**  
 1330 **Ende** Stop Codon  
 1333-1338 **HindIII**

```

1      GAA TTC ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GAT GAC GAT GAC AAA GCC AAA CAC
52     GTA GTC GTT ATC GGG GGT GGC GTG GGT GGT ATT GCC ACT GCA TAT AAC CTG
103    CGT AAC CTG ATG CCT GAT CTG AAA ATC ACG TTA ATT TCG GAC CGT CCA TAC
154    TTC GGC TTC ACC CCA GCG TTT CCG CAC CTG GCG ATG GGG TGG CGT AAA TTC
205    GAG GAT ATT AGC GTG CCG CTG GCG CCT CTG CTG CCA AAA TTT AAC ATT GAG
256    TTC ATT AAT GAG AAA GCT GAA AGT ATT GAC CCT GAC GCC AAT ACA GTT ACG
307    ACC CAG AGC GGA AAA AAG ATT GAA TAC GAC TAT CTG GTC ATT GCT ACT GGC
358    CCG AAA TTG GTG TTC GGC GCC GAA GGC CAG GAA GAG AAC TCC ACA AGT ATT
409    TGC ACG GCA GAG CAT GCC CTG GAA ACT CAG AAA AAG CTG CAA GAA CTG TAT
460    GCC AAC CCA GGC CCA GTC GTG ATT GGC GCG ATT CCG GGC GTA AGC TGC TTC
511    GGT CCT GCG TAT GAA TTT GCT CTT ATG CTG CAT TAT GAA TTA AAA AAG CGG
562    GGT ATC CGC TAC AAA GTG CCT ATG ACT TTT ATT ACG TCA GAG CCG TAT CTG
613    GGA CAT TTC GGT GTC GGT GGT ATC GGT GCA TCT AAA CGG CTG GTA GAA GAT
664    CTC TTC GCA GAA CGC AAC ATC GAT TGG ATC GCT AAT GTC GCG GTC AAA GCT
715    ATT GAG CCG GAT AAA GTG ATC TAT GAG GAT CTG AAT GGC AAC ACC CAC GAG
766    GTT CCG GCC AAG TTT ACA ATG TTT ATG CCG TCT TTT CAG GGC CCG GAA GTA
817    GTG GCG TCA GCA GGA GAC AAA GTT GCT AAC CCG GCC AAT AAA ATG GTC ATT
868    GTT AAC CGT TGC TTT CAG AAT CCG ACC TAC AAA AAT ATC TTT GGG GTG GGT
919    GTT GTT ACG GCT ATT CCG CCG ATC GAA AAA ACC CCA ATC CCA ACC GGA GTT
970    CCG AAA ACC GGC ATG ATG ATC GAA CAA ATG GCA ATG GCG GTG GCA CAC AAT
1021   ATC GTG AAC GAT ATT CGC AAC AAC CCG GAT AAG TAC GCG CCG CGC TTG TCC
1072   GCA ATC TGT ATC GCC GAT TTC GGC GAA GAT GCA GGC TTT TTC TTT GCG GAC
1123   CCA GTT ATT CCA CCG CGT GAA CGC GTG ATC ACC AAG ATG GGC AAA TGG GCG
1174   CAT TAC TTC AAA ACC GCG TTT GAA AAA TAT TTT CTG TGG AAG GTA CGT AAT
1225   GGT AAC ATT GCC CCG AGC TTT GAA GAA AAA GTT CTC GAA ATC TTC CTG AAA
1276   GTG CAT CCG ATT GAG CTG TGC AAG GAC TGT GAA GGT GCG CCG GGC TCG CGC
1327   TGT TAA AAG CTT

```

## 9.2. Oligonukleotidsequenzen für die Gensynthese

Die Synthese des Codon adaptierten *casqr*-Genes aus Oligonukleotidbausteinen wurde gemäß Fuhrmann et al. (1999) durchgeführt. Die Zerlegung des Genes in Oligonukleotide einer durchschnittlichen Länge von 50 bp wurde von der Firma Entelechon (Regensburg, Deutschland) durchgeführt.

Bezeichnung	Sequenz
f01	5' CGAGAATTCATGCATCACCATC 3'
f02	5' ACCATCACGATGACGATGACAAAAGCCAAACACGTAGTCGTTATC 3'
f03	5' GGGGGTGGCGTGGGTGGTATTGCCACTGCATATAACCTGC 3'
f04	5' GTAACCTGATGCCTGATCTGAAAAATCACGTTAATTTCCGGACCGTC 3'
f05	5' CATACTTCGGCTTCACCCAGCGTTTCCGCACCTGGCGATGGG 3'
f06	5' GTGGCGTAAATTCGAGGATATTAGCGTGCCGCTGGCGCCTCTGCT 3'
f07	5' GCCAAAATTTAACATTGAGTTCATTAATGAGAAAGCTGAAAGTATTGACCC 3'
f08	5' TGACCCAATACAGTTACGACCCAGAGCGGAAAAAAGATTGAATACGAC 3'
f09	5' TATCTGGTCATTGCTACTGGCCCGAAATTTGGTGTTCGGCGCCGAAG 3'
f10	5' GCCAGGAAGAGAATCCACAAGTATTTGCACGGCAGAGCATGCC 3'
f11	5' TGGAAACTCAGAAAAAGCTGCAAGAACTGTATGCCAACCCAGGCCCA 3'
f12	5' GTCGTGATTGGCGCGATTCCGGGCGTAAGCTGCTTCGGTCTCTG 3'
f13	5' CGTATGAATTTGCTCTTATGCTGCATTATGAATTAATAAGCGGGGTATC 3'
f14	5' CGCTACAAAAGTGCCATGACTTTTTATTACGTCAGAGCCGTATCTGG 3'
f15	5' GACATTTCCGGTGTCCGGTGGTATCGGTGCATCTAAACGGCTGGTA 3'
f16	5' GAAGATCTCTTCGAGAACGCAACATCGATTGGATCGCTAATGTCG 3'
f17	5' CGGTCAAAGCTATTGAGCCGGATAAAGTGATCTATGAGGATCTGAATG 3'
f18	5' GCAACACCCACGAGGTTCCGGCCAAGTTTACAATGTTTATGCCGT 3'
f19	5' CTTTTCAGGGCCCGAAGTAGTGGCGTCAGCAGGAGACAAAGTT 3'
f20	5' GCTAACCCGGCCAATAAAAATGGTCATTGTTAACCGTTGCTTTTCAGAAT 3'
f21	5' CCGACCTACAAAAATATCTTTGGGGTGGGTGTTGTTACGGCTATTC 3'
f22	5' CGCCGATCGAAAAAACCCCAATCCCAACCGGAGTTCCGAAAAC 3'
f23	5' CGGCATGATGATCGAACAAAATGGCAATGGCGGTGGCACACAATATC 3'
f24	5' GTGAACGATATTCGCAACAACCCGGATAAGTACGCGCCGCGCTT 3'
f25	5' GTCGCAATCTGTATCGCCGATTTCCGGCAAGATGCAGGCTTTTT 3'
f26	5' CTTTGCGGACCCAGTTATTCACCCGCTGAACGCGTGATCACCA 3'
f27	5' AGATGGGCAAAATGGGCGCATTACTTCAAAAACCGGTTTGA AAAATATT 3'
f28	5' TTCTGTGGAAGGTACGTAATGGTAACATTGCCCCGAGCTTTGAAGAA 3'
f29	5' AAAGTTCTCGAAATCTTCCTGAAAAGTGCATCCGATTGAGCTGTGCAA 3'
f30	5' GGACTGTGAAGGTGCGCCGGGCTCGCGCTGTTAAAAGCTTGCC 3'
r01	5' TTGTCATCGTCATCGTGATGGTGATGGTGATGCATGAATTCTCG 3'
r02	5' ACCACCCACGCCACCCCGATAACGACTACGTGTTTGGCT 3'
r03	5' TTCAGATCAGGCATCAGGTTACGCAGGTTATATGCAGTGGCAAT 3'
r04	5' GCTGGGGTGAAGCCGAAGTATGGACGGTCCGAAATTAACGTGATT 3'
r05	5' GCTAATATCCTCGAATTTACGCCACCCCATCGCCAGGTGCGGAAAC 3'
r06	5' TTAATGAACTCAATGTTAAATTTTGGCAGCAGAGGCGCCAGCGGCAC 3'
r07	5' GGGTCGTAACGTATTGGCGTCAGGGTCAATACTTTTCAGCTTTCTCA 3'
r08	5' GGGCCAGTAGCAATGACCAGATAGTCGTATTCAATCTTTTTTCCGCTCT 3'
r09	5' ACTTGTGGAGTTCTCTTCCTGGCCTTCGGCGCCGAACACCAATTC 3'
r10	5' TCTTGCAGCTTTTTCTGAGTTTCCAGGGCATGCTCTGCCGTGCAAAT 3'
r11	5' CCGGAATCGCGCCAATCACGACTGGGCTGGGTTGGCATAACAGT 3'
r12	5' GCAGCATAAGAGCAAATTCATACGCAGGACCGAAGCAGCTTACGC 3'
r13	5' AAAAGTCATAGGCACTTTGTAGCGGATAACCCGCTTTTTTAAATTCATAAT 3'
r14	5' ATACCACCGACACCGAAATGTCCAGATACGGCTCTGACGTAAT 3'
r15	5' TTGCGTTCTGCGAAGAGATCTTCTACCAGCCGTTTAGATGCACCG 3'
r16	5' TCCGGCTCAATAGCTTTGACCGCGACATTAGCGATCCAATCGATG 3'

---

r17	5' CCGGAACCTCGTGGGTGTTGCCATTCAGATCCTCATAGATCACTTTA 3'
r18	5' ACTACTTCCGGGCCCTGAAAAGACGGCATAAACATTGTAAACTTGG 3'
r19	5' ACCATTTTATTGGCCGGTTAGCAACTTTGTCTCCTGCTGACGCC 3'
r20	5' CCCAAAGATATTTTTGTAGGTTCGGATTCTGAAAGCAACGGTTAACAATG 3'
r21	5' ATTGGGGTTTTTTTCGATCGGCGGAATAGCCGTAACAACACCCAC 3'
r22	5' CCATTTGTTTCGATCATCATGCCGGTTTTTCGGAACTCCGGTTGGG 3'
r23	5' GGGTTGTTGCGAATATCGTTACGATATTGTGTGCCACCGCCATTG 3'
r24	5' ATCGGCGATACAGATTGCGGACAAGCGCGGCGGTACTTATCC 3'
r25	5' GTGGAATAACTGGGTCCGCAAAGAAAAAGCCTGCATCTTCGCCGAA 3'
r26	5' TAATGCGCCCATTGCCCATCTTGGTGATCACGCGTTCACGCG 3'
r27	5' TACCATTACGTACCTTCCACAGAAAATATTTTTCAAACGCGTTTTGAAG 3'
r28	5' CTTTCAGGAAGATTTTCGAGAACTTTTTCTTCAAAGCTCGGGGCAATGT 3'
r29	5' CCGGCGCACCTTCACAGTCCTTGCACAGCTCAATCGGATGCA 3'
r30	5' GGCAAGCTTTTAAACAGCGGAGC 3'
f05C	5' CATACTTCGGCTTCTGCCAGCGTTTTCCGCACCTGGCGATGGG 3'
r04C	5' GCTGGGCAGAAGCCGAAGTATGGACGGTCCGAAATTAACGTGATT 3'
f20PCR	5' CGAAAGCTTGCTAACCCGGCCAATAAAAATGGTCATTG 3'
r10PCR	5' GACGAATTCGCAGCTTTTTCTGAGTTTCCAGGGCATGC 3'
r20PCR	5' GACCTGCAGCGGATTCTGAAAGCAACGGTTAACAATGACC 3'
f10PCR	5' GTCCTGCAGCTCCACAAGTATTTGCACGGCAGAGCATGC 3'
f01PCRE	5' CGAGAATTCATGCATCACCATCACCATCACG 3'
f01PCRN	5' CGACATATGATGCATCACCATCACC 3'
f02PCRN	5' CGACATATGGCCAAAACACGTAGTCGTTATCGGGG 3'

### 9.3. Graphische Codon-Gebrauchs Analyse

Zur graphischen Darstellung des Codon-Gebrauchs wurde eine internetbasierende Anwendung programmiert. Als Programiersprache wurde php (PHP Hypertext Preprocessor, <http://www.php.net/>) verwendet. Zur Erzeugung von Dateien im Adobe Portable Document Format „pdf“ (Adobe Systems Inc., Saggart, Irland ) wurde die Proqrambibliothek pdfliib (<http://www.pdfliib.com/>, PDFliib GmbH, München, Deutschland) in den php-Dienst eingebunden. Die Codon-Gebrauchs-Tabellen wurden von der öffentlichen Kazusa Datenbank (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>, Kazusa DNA Research Institute, Chiba, Japan) importiert.

Das Programm ist unter folgender Adresse ausführbar:

<http://gcu.a.schoedl.de/>

Es bietet drei Ausgabeformatmöglichkeiten:

<i>html</i>	Graphisches Ausgabeformat für Internetbrowser
<i>pdf</i>	für Druckausgabe optimiertes Ausgabeformat
<i>plaintext</i>	Rohdatenformat zum Erstellen von Diagrammen mittels Tabellenkalkulationssoftware

Das Programm errechnet ferner einen über alle 64 Codons des universellen genetischen Codes gemittelten Unterschied der Abweichung eines Genes vom Codon-Gebrauch des Expressionsorganismus. Dieser Wert wird als „mean difference“ bezeichnet, und spiegelt den Unterschied im Codon-Gebrauch von Fremdgen und Expressionsorganismus wider.

## 10. Literatur

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**(3), 403-10.
- Anbar, A. D. und Knoll, A. H.** (2002). Proterozoic ocean chemistry and evolution: a bioinorganic bridge? *Science* **297**(5584), 1137-42.
- Arieli, B., Padan, E. und Shahak, Y.** (1991). Sulfide induced sulfide-quinone reductase activity in thylakoids of *Oscillatoria limnetica*. *J Biol Chem* **266**(1), 104-11.
- Arieli, B., Shahak, Y., Taglicht, D., Hauska, G. und Padan, E.** (1994). Purification and characterization of sulfide-quinone reductase (SQR), a novel enzyme driving anoxygenic photosynthesis in *Oscillatoria limnetica*. *J Biol Chem* **269**, 5705-11.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F. et al.** (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**(5331), 1453-74.
- Bolli, R., Nalecz, K. A. und Azzi, A.** (1985). The interconversion between monomeric and dimeric bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochimie* **67**(1), 119-28.
- Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M. und Parker, J.** (1997). "Biology of Microorganisms." 8. ed. N. Prentice-Hall, Upper Saddle River.
- Bronstein, M., Schütz, M., Hauska, G., Padan, E. und Shahak, Y.** (2000). Cyanobacterial sulfide-quinone reductase (SQR): cloning and heterologous expression. *J Bacteriol* **182**(12), 3336-44.
- Brune, D. C.** (1989). Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. *Biochim Biophys Acta* **975**(2), 189-221.
- Brune, D. C.** (1995). Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. In "Anoxygenic photosynthetic bacteria" (R. E. Blankenship, M. T. Madigan und C. E. Bauer, eds.), pp. 847-870. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- Brune, D. C. und Trüper, H. G.** (1986). Noncyclic electron transport in chromatophores of photolithotrophically grown *Rhodobacter sulfidophilus*. *Arch Microbiol* **145**, 295-301.
- Byron, C. M., Stankovich, M. T., Husain, M. und Davidson, V. L.** (1989). Unusual redox properties of electron-transfer flavoprotein from *Methylophilus methylotrophus*. *Biochemistry* **28**(21), 8582-7.
- Cabral, F. und Schatz, G.** (1979). High resolution one- and two-dimensional electrophoretic analysis of mitochondrial membrane polypeptides. *Methods Enzymol* **56**, 602-613.
- Cacciapuoti, G., Porcelli, M., Carteni-Farina, M., Gambacorta, A. und Zappia, V.** (1986). Purification and characterization of propylamine transferase from *Sulfolobus solfataricus*, an extreme thermophilic archaeobacterium. *Eur J Biochem* **161**(2), 263-71.
- Campbell, N. A.** (1997). "Biologie." Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- Carrier, T., Jones, K. L. und Keasling, J. D.** (1998). mRNA stability and plasmid copy number effects on gene expression from an inducible promoter system. *Biotechnol Bioeng* **59**(6), 666-72.
- Chen, Z. W., Koh, M., Van Driessche, G., Van Beeumen, J. J., Bartsch, R. G., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A. und Mathews, F. S.** (1994). The Structure of Flavocytochrome *c* Sulfide Dehydrogenase from a Purple Phototrophic Bacterium. *Science* **266**(5184), 430-2.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. und Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **69**, 2110-2114.
- Collins, M. D. und Jones, D.** (1981). Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiol Rev* **45**(2), 316-54.
- Crosson, S., Rajagopal, S. und Moffat, K.** (2003). The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* **42**(1), 2-10.
- Cusanovich, M. A., Meyer, T. E. und Bartsch, R. G.** (1991). Flavocytochrome *c*. In "Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes, Vol. II" (F. Müller, ed.), pp. 377-393. CRC Press, Boca Raton.
- Deckert, G., Warren, P. V., Gaasterland, T., Young, W. G., Lenox, A. L., Graham, D. E., Overbeek, R., Snead, M. A., Keller, M., Aujay, M. et al.** (1998). The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* **392**(6674), 353-358.
- Duewel, H. S., Sheflyan, G. Y. und Woodard, R. W.** (1999). Functional and biochemical characterization of a recombinant 3-Deoxy-D-manno-octulosonic acid 8-phosphate synthase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Biochem Biophys Res Commun* **263**(2), 346-51.
- Dutton, P. L.** (1978). Redox Potentiometry: Determination of Midpoint Potentials of Oxidation-Reduction Components of Biological Electron-Transfer Systems. *Methods Enzymol* **54**, 411-435.
- Dym, O. und Eisenberg, D.** (2001). Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci* **10**(9), 1712-28.
- Engels, A., Kahmann, U., Ruppel, H. G. und Pistorius, E. K.** (1997). Isolation, partial characterization and localization of a dihydrolipoamide dehydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* **1340**, 33-44.
- Fedorov, R., Schlichting, I., Hartmann, E., Domratcheva, T., Fuhrmann, M. und Hegemann, P.** (2003). Crystal Structures and Molecular Mechanism of a Light-Induced Signaling Switch: The Phot-LOV1 Domain from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys J* **84**(4), 2474-82.
- Freire-Picos, M. A., Rodriguez-Torres, A. M. und Esperanza Cerdan, M.** (1995). Yeast phylogenetic relationships based on cytochrome *c* sequences. *Microbios* **81**(326), 23-7.

- Friedrich, C. G.** (1998). Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria. *Adv Microb Physiol* **39**, 235-89.
- Friedrich, C. G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A. und Fischer, J.** (2001). Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl Environ Microbiol* **67**(7), 2873-82.
- Fuhrmann, M., Oertel, W. und Hegemann, P.** (1999). A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **19**(3), 353-61.
- Ghisla, S. und Massey, V.** (1989). Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. *Eur J Biochem* **181**(1), 1-17.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. und Hanahan, D.** (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 4645-9.
- Griesbeck, C.** (1998). Molekularbiologische Untersuchungen an der Sulfid-Chinon Reduktase (SQR). Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenphysiologie, Universität Regensburg.
- Griesbeck, C.** (2001). Sulfid-Chinon Reduktase (SQR) aus *Rhodobacter capsulatus*: Physikochemische Charakterisierung und Studien zum katalytischen Mechanismus. Dissertation an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg.
- Griesbeck, C., Hauska, G. und Schütz, M.** (2000). Biological Sulfide Oxidation: Sulfide-Quinone-Reductase (SQR), the Primary Reaction. In "Recent Research Developments in Microbiology, Vol. 4" (S. G. Pandalai, ed.), pp. 179-203. Research Signpost, Trivandrum, India.
- Griesbeck, C., Schutz, M., Schödl, T., Bathe, S., Nausch, L., Mederer, N., Vielreicher, M. und Hauska, G.** (2002). Mechanism of sulfide-quinone reductase investigated using site-directed mutagenesis and sulfur analysis. *Biochemistry* **41**(39), 11552-65.
- Grieshaber, M. K. und Völkel, S.** (1998). Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annu Rev Physiol* **60**, 33-53.
- Guex, N. und Peitsch, M. C.** (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**(15), 2714-23.
- Hahlbeck, E., Arndt, C. und Schiedek, D.** (2000). Sulphide detoxification in *Hediste diversicolor* and *Marenzelleria viridis*, two dominant polychaete worms within the shallow coastal waters of the southern Baltic Sea. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **125**(4), 457-71.
- Hanes, C. S.** (1932). Studies on plant amylase. I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem.J.* **26**, 1406-1421.
- Hansen, T. A. und Van Gernerden, H.** (1972). Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria. *Arch Microbiol* **86**(1), 49-56.
- Holleman, A. F., Wiberg, E. und Wiberg, N.** (1995). "Lehrbuch der Anorganischen Chemie." deGruyter, Berlin.

- Hooper, K. L., Joneja, B., White, H. B., 3rd und Thorpe, C.** (1996). A sulfhydryl oxidase from chicken egg white. *J Biol Chem* **271**(48), 30510-6.
- Huber, R., Wilharm, T., Huber, D., Trincone, A., Burggraf, S., König, H., Rachel, R., Rockinger, I., Fricke, H. und Stetter, K. O.** (1992). *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., Represents anovel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *System.Appl.Microbiol.* **15**, 340-351.
- Ikemura, T.** (1985). Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol Biol Evol* **2**(1), 13-34.
- Iyer, R. B., Wang, J. und Bachas, L. G.** (2002). Cloning, expression, and characterization of the *gsdA* gene encoding thermophilic glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aquifex aeolicus*. *Extremophiles* **6**(4), 283-9.
- Jaenicke, R. und Böhm, G.** (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Current Opinion in Structural Biology* **8**(6), 738-748.
- Kane, J. F.** (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **6**(5), 494-500.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K. et al.** (2002). Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* **9**(6), 189-97.
- Karplus, P. A. und Schulz, G. E.** (1987). Refined Structure of Glutathione Reductase at 1.54 Å Resolution. *J.Mol.Biol.* **195**(3), 701-729.
- Kelly, D. P., Shergill, J. K., Lu, W. P. und Wood, A. P.** (1997). Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**, 95-107.
- Knaff, D. B. und Buchanan, B. B.** (1975). Cytochrome *b* and photosynthetic sulfur bacteria. *Biochim Biophys Acta* **376**, 549-560.
- Kottke, T., Heberle, J., Hehn, D., Dick, B. und Hegemann, P.** (2003). Phot-LOV1: Photocycle of a Blue-Light Receptor Domain from the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys J* **84**(2), 1192-201.
- Kraft, B. J., Masuda, S., Kikuchi, J., Dragnea, V., Tollin, G., Zaleski, J. M. und Bauer, C. E.** (2003). Spectroscopic and mutational analysis of the blue-light photoreceptor AppA: a novel photocycle involving flavin stacking with an aromatic amino acid. *Biochemistry* **42**(22), 6726-34.
- Laemmli, U.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-5.
- Lao, P. J. und Forsdyke, D. R.** (2000). Thermophilic bacteria strictly obey Szybalski's transcription direction rule and politely purine-load RNAs with both adenine and guanine. *Genome Res* **10**(2), 228-36.
- Lemma, E., Unden, G. und Kroger, A.** (1990). Menaquinone is an obligatory component of the chain catalyzing succinate respiration in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* **155**(1), 62-7.



- Lim, J. H., Choi, J., Han, S. J., Kim, S. H., Hwang, H. Z., Jin, D. K., Ahn, B. Y. und Han, Y. S.** (2001). Molecular cloning and characterization of thermostable DNA ligase from *Aquifex pyrophilus*, a hyperthermophilic bacterium. *Extremophiles* **5**(3), 161-8.
- Lynn, D. J., Singer, G. A. und Hickey, D. A.** (2002). Synonymous codon usage is subject to selection in thermophilic bacteria. *Nucleic Acids Res* **30**(19), 4272-7.
- Mande, S. S., Sarfaty, S., Allen, M. D., Perham, R. N. und Hol, W. G.** (1996). Protein-protein interactions in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex: dihydrolipoamide dehydrogenase complexed with the binding domain of dihydrolipoamide acetyltransferase. *Structure* **4**(3), 277-86.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J.** (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual." 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., DeWeese-Scott, C., Fedorova, N. D., Geer, L. Y., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Lanczycki, C. J. et al.** (2003). CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Res* **31**(1), 383-7.
- Mathews, F. S.** (1991). New flavoenzymes. *Current Opinion in Structural Biology* **1**, 954-967.
- Mattevi, A., Schierbeek, A. J. und Hol, W. G.** (1991). Refined crystal structure of lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* at 2.2 Å resolution. A comparison with the structure of glutathione reductase. *J Mol Biol* **220**(4), 975-94.
- Mederer, N.** (2000). Untersuchungen zur Sulfid-Chinon-Reduktase von *Rhodobacter capsulatus*. Zulassungsarbeit Staatsexamen ausgeführt am Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenphysiologie der Universität Regensburg.
- Müller, F.** (1991). Free Flavin: Synthesis, Chemical and Physical Properties. In "Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes; Volume I" (F. Müller, ed.), pp. 1-73. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.
- Munro, A. W. und Noble, M. A.** (1999). Fluorescence Analysis of Flavoproteins. In "Flavoprotein Protocols" (S. K. Chapman und G. A. Reid, eds.), pp. 25-47. Humana Press Inc., Totowa.
- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S. et al.** (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *Int J Syst Evol Microbiol* **51**(Pt 2), 433-46.
- Notredame, C., Higgins, D. G. und Heringa, J.** (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* **302**(1), 205-17.
- Nübel, T., Klughammer, C., Huber, R., Hauska, G. und Schütz, M.** (2000). Sulfide-quinone reductase in membranes of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus* VF5. *Arch Microbiol* **173**(4), 233-44.

- O'Brien, J. und Vetter, R. D.** (1990). Production of thiosulphate during sulphide oxidation by mitochondria of the symbiont-containing bivalve *Solemya reidi*. *J Exp Biol* **149**, 133-48.
- Pachmayr, F.** (1960). Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen in Mineralwasser. Dissertation, Universität München.
- Parrino, V., Kraus, D. W. und Doeller, J. E.** (2000). ATP production from the oxidation of sulfide in gill mitochondria of the ribbed mussel *Geukensia demissa*. *J Exp Biol* **203 Pt 14**, 2209-18.
- Rao, N. A., Felton, S. P. und Huennekens, F. M.** (1967). Quantitative Determination of Mitochondrial Flavins. *Methods Enzymol.* **10**, 494-499.
- Reinartz, M., Tschaepe, J., Brueser, T., Trueper, H. G. und Dahl, C.** (1998). Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch Microbiol* **170**(1), 59-68.
- Schödl, T.** (2000). Sulfide-Quinone-Reductase (SQR): a fluorescent probe for hydrogensulfide. Diplomarbeit an der naturwissenschaftlichen Fakultät IV Chemie und Pharmazie angefertigt an der naturwissenschaftlichen Fakultät III Biologie und Vorklinische Medizin, Universität Regensburg.
- Schütz, M.** (1997). Die Sulfid-Chinon Reduktase (SQR) von *Rhodobacter capsulatus* DSM 155. Biochemische Charakterisierung, Sequenzauswertung, heterologe Expression und Inaktivierung. Dissertation an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg.
- Schütz, M., Griesbeck, C., Bronstein, M., Maldener, I., Shahak, Y., Padan, E. und Hauska, G.** (1998a). Sulfide-Quinone Reductase (SQR) of *Rhodobacter capsulatus*: expression, induction and inactivation. In "International Congress on Photosynthesis (Budapest, 1998)" (G. Garab, ed.).
- Schütz, M., Klughammer, C., Griesbeck, C., Quentmeier, A., Friedrich, C. G. und Hauska, G.** (1998b). Sulfide-quinone reductase activity in membranes of the chemotrophic bacterium *Paracoccus denitrificans* GB17. *Arch. Microbiol.* **170**(5), 353-360.
- Schütz, M., Schoepp-Cothenet, B., Lojou, E., Woodstra, M., Lexa, D., Tron, P., Dolla, A., Durand, M. C., Nitschke, W., Stetter, K. O. et al.** (2003). The cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex from *Aquifex aeolicus*. *Biochemistry in press*.
- Schütz, M., Shahak, Y., Padan, E. und Hauska, G.** (1997). Sulfide-quinone reductase from *Rhodobacter capsulatus*: Purification, cloning and expression. *J Biol Chem* **272**(15), 9890-4.
- Seed, B.** (1987). An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2. *Nature* **329**(6142), 840-2.
- Shahak, Y., Arieli, B., Binder, B. und Padan, E.** (1987). Sulfide-dependent photosynthetic electron flow coupled to proton translocation in thylakoids of the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Arch Biochem Biophys* **259**, 605-615.
- Shahak, Y., Klughammer, C., Padan, E., Herrmann, I. und Hauska, G.** (1994). Sulfide-quinone and sulfide-cytochrome reduction in *Rhodobacter capsulatus*. *Photosyn Res* **39**, 175-181.

- Shindyalov, I. N. und Bourne, P. E.** (1998). Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path. *Protein Eng* **11**(9), 739-47.
- Staal, G. E., Visser, J. und Veeger, C.** (1969). Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* **185**(1), 39-48.
- Stetter, K. O.** (1996). Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **18**, 149-158.
- Steudel, R.** (1996). Mechanism for the Formation of Elemental Sulfur from Aqueous Sulfide in Chemical and Microbiological Desulfurization Processes. *Ind.Eng.Chem.Res.* **35**, 1417-1423.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W.** (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89.
- Stülke, J.** (2002). Control of transcription termination in bacteria by RNA-binding proteins that modulate RNA structures. *Arch Microbiol* **177**(6), 433-40.
- Takeuchi, F., Futamura, Y., Yoshikura, H. und Yamamoto, K.** (2003). Statistics of trinucleotides in coding sequences and evolution. *J Theor Biol* **222**(2), 139-49.
- Tanner, J. J., Hecht, R. M. und Krause, K. L.** (1996). Determinants of enzyme thermostability observed in the molecular structure of *Thermus aquaticus* D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at 25 Angstroms Resolution. *Biochemistry* **35**(8), 2597-609.
- Thauer, R. K., Jungermann, K. und Decker, K.** (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* **41**(1), 100-80.
- Theissen, U., Hoffmeister, M., Grieshaber, M. und Martin, W.** (2003). Single Eubacterial Origin of Eukaryotic Sulfide:Quinone Oxidoreductase, a Mitochondrial Enzyme Conserved from the Early Evolution of Eukaryotes During Anoxic and Sulfidic Times. *Mol Biol Evol* in press.
- Thorpe, C. und Williams, C. H., Jr.** (1981). Lipoamide dehydrogenase from pig heart. Pyridine nucleotide induced changes in monoalkylated two-electron reduced enzyme. *Biochemistry* **20**(6), 1507-13.
- Trüper, H. G. und Schlegel, H. G.** (1964). Sulphur metabolism in *Thiorhodaceae*. 1. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **30**, 225-238.
- Van Driessche, G., Koh, M., Chen, Z. W., Mathews, F. S., Meyer, T. E., Bartsch, R. G., Cusanovich, M. A. und Van Beeumen, J. J.** (1996). Covalent structure of the flavoprotein subunit of the flavocytochrome c: sulfide dehydrogenase from the purple phototrophic bacterium *Chromatium vinosum*. *Protein Sci* **5**(9), 1753-64.
- Vande Weghe, J. G. und Ow, D. W.** (1999). A fission yeast gene for mitochondrial sulfide oxidation. *J Biol Chem* **274**(19), 13250-7.
- Visser, J. M., De Jong, G. A. H., Robertson, L. A. und Kuenen, J. G.** (1997). A novel membrane-bound flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from the colourless sulfur bacterium *Thiobacillus* sp. W5. *Arch Microbiol* **167**, 295-301.

- 
- Williams Jr., C. H.** (1992). Lipoamide Dehydrogenase, Glutathione Reductase, Thioredoxin Reductase, And Mercuric Ion Reductase - A Family Of Flavoenzyme Transhydrogenases. *In* "Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes, Vol. III" (F. Müller, ed.), pp. 121-211. CRC Press, Boca Raton.
- Yagi, T., Seo, B. B., Di Bernardo, S., Nakamaru-Ogiso, E., Kao, M. C. und Matsuno-Yagi, A.** (2001). NADH dehydrogenases: from basic science to biomedicine. *J Bioenerg Biomembr* **33**(3), 233-42.
- Yong, R. und Searcy, D. G.** (2001). Sulfid oxidation coupled to ATP synthesis in chicken liver mitochondria. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **129**(1), 129-37.

---

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden veröffentlicht oder auf Tagungen vorgestellt:

**Veröffentlichungen in Vorbereitung:**

Schödl, T.     Graphical Codon Usage Analysis  
                  An internet based program for codon usage analysis  
                  Bioinformatics

Schödl T., Griesbeck C., Schütz M., Hauska G.  
                  The thermostable sulfide-quinone reductase from *Aquifex aeolicus*:  
                  Expression, Purification and biochemical Characterisation  
                  Protein Expression and Purification

**Tagungsberichte:**

- 2001    Sommertagung des Graduiertenkollegs Sensorische Photorezeptoren  
          The Development of a Fluorescent Microsensor for Sulfide with a Flavoprotein.  
          Nove Hradý, CZ
- 2002    Sommertagung des Graduiertenkollegs Sensorische Photorezeptoren  
          The thermostable sulfide-quinone reductase from *Aquifex aeolicus*.  
          Nove Hradý, CZ

# Dank

Den größten Dank haben meine Eltern verdient. Ihnen verdanke ich nicht nur die Möglichkeit, meinen Neigungen und Interessen nachgehen zu können, sondern auch die stille, letztendliche Geborgenheit, die nötig ist um ein glückliches Leben führen zu können.

Bei Herrn Prof. Dr. Günter Hauska möchte ich mich besonders für die Vergabe des interessanten Themas und das Vertrauen sowie den aufmunternden Zuspruch in anfänglich weniger erfolgreichen Phasen dieser Arbeit bedanken. Für sein Verständnis, seine Zeit und seine Offenheit, nicht nur in wissenschaftlichen Diskussionen, bedanke ich mich herzlich, da sie den gegenseitigen Umgang erleichterten.

Ohne Dr. Christoph Griesbeck wäre diese Arbeit sicherlich nicht zustande gekommen. Er war es, der mir Molekularbiologie und Proteinbiochemie praktisch und theoretisch vermittelte. Nicht nur in Bezug auf unser Musizieren möchte ich mich bei Ihm für unser stets harmonisches Verhältnis bedanken. Vielen Dank für die freundschaftliche Kritik und Zeit zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. Peter Hegemann danke ich für eine Vielzahl erheiternder Gespräche. Neben den zahllosen organisatorischen Besprechungen kam die Erörterung wissenschaftlicher Sachverhalte viel zu kurz. Gerne hätte ich mehr von seinen Vorstellungen über Photobiologie erfahren.

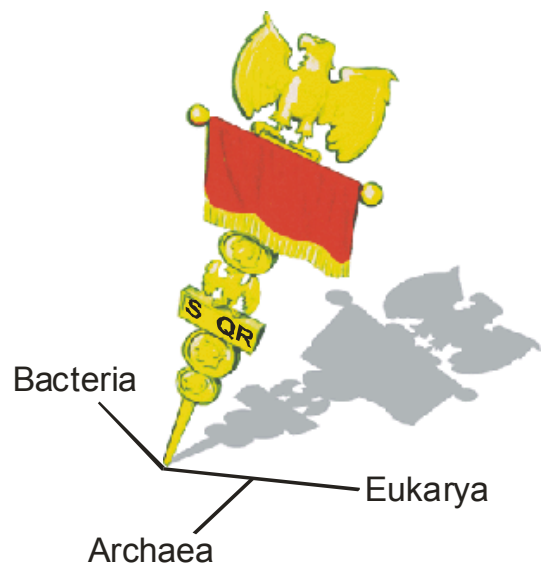
Monika Kammerer danke ich für Ihre stete Bereitschaft mit mir über alles Mögliche zu streiten, obwohl sie eigentlich meiner Meinung war und ist. Oftmals war nur so der Laboralltag erträglich.

Bei vielen Freunden und Lehrern möchte ich mich für die in vielerlei Art und Weise erfahrene Ermutigung und Unterstützung bedanken, nicht nur was diese Arbeit betrifft. Herzlichen Dank Matthias<sup>2</sup>, Christian, Jürgen, Gabi, Doris, Angus, Leika, Iris, Stefan, Felix, Thomas.....

Bei Dr. Michael „knowing everything“ Schütz bedanke ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und dafür, dass er fast auf jede Frage und jedes Problem eine Antwort wusste.

Bei Herrn Helmut Schmid und bei Herrn Martin Schlapschy bedanke ich mich dafür, dass Sie mich für die Chemie begeistert haben. Wo wäre ich nur sonst gelandet?

Bei der Arbeitsgruppe von Prof. Hegemann bedanke ich mich für den Titel „Dauergast“ und die stets freundliche Aufnahme, bei allen Graduierten und Betreuern des Graduiertenkollegs „Sensorische Photorezeptoren“ bedanke ich mich für das Vertrauen in mich und mein Organisationstalent. Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen am Lehrstuhl Tanner gilt mein besonderer Dank: Ich habe mich hier sehr wohl gefühlt!



**SQR is everywhere!**

Regensburg den 25. Juli 2003

---

Thomas Schödl