

**Sulfid-Chinon Reduktase (SQR) aus *Rhodobacter capsulatus*:
Physikochemische Charakterisierung und Studien zum
katalytischen Mechanismus**

Dissertation

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

vorgelegt von

Christoph Griesbeck

aus Eichstätt

Regensburg, 2001

Promotionsgesuch eingereicht am: 23.10.2001

Die 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. Reinhard Wirth (3. Prüfer)

Tag des Promotionskolloquiums: 17.12.2001

1. Inhalt

1. Inhalt	3
2. Abkürzungen	6
3. Zusammenfassung	8
4. Einleitung	10
4.1. Biologische Umwandlung von Schwefelverbindungen	10
4.1.1. Mikrobielle Oxidation von Sulfid	10
4.1.2. Sulfidoxidation bei Eukaryoten	13
4.2. Die Sulfid-Chinon Reduktase (SQR)	14
4.2.1. Entdeckung der SQR	14
4.2.2. Eigenschaften der SQR	15
4.2.2.1. Eigenschaften des Proteins	15
4.2.2.2. <i>sqr</i> -Gene und Aminosäuresequenzen	15
4.2.3. Regulation der Expression der SQR bei <i>Rb. capsulatus</i>	19
4.2.4. Verbreitung der SQR	19
4.3. Flavoproteine der Disulfid-Oxidoreduktase-Familie	20
4.4. Ziel der Arbeit	21
5. Ergebnisse	22
5.1. Heterologe Expression und Reinigung der SQR aus <i>Rb. capsulatus</i>	22
5.2. Charakterisierung der heterolog exprimierten SQR	24
5.2.1. Spezifische Aktivität	24
5.2.1.1. Bestimmung des Differenz-Extinktionskoeffizienten von dUQ in wässriger Lösung und Optimierung der Versuchsbedingungen	24
5.2.1.2. Spezifische Aktivität der SQR	25
5.2.2. Substrataffinität	25
5.2.3. FAD-Gehalt	26
5.2.4. Fluoreszenzspektroskopie	26
5.2.5. Isoelektrischer Punkt	27
5.2.6. pH-Abhängigkeit der SQR-Reaktion	28
5.2.7. CD-Spektroskopie	29
5.2.8. Temperaturabhängigkeit und Stabilität	31
5.2.8.1. Temperaturabhängigkeit der SQR-Aktivität	31
5.2.8.2. Temperaturabhängigkeit der SQR-Stabilität	32
5.2.8.3. Lichtabhängigkeit der SQR-Stabilität	32
5.2.9. Redoxtitration des Flavins in der SQR	33
5.3. Sequenzspezifische Mutagenese	36
5.3.1. Cys127Ser, Cys159Ser und Cys353Ser	36
5.3.1.1. Komplementation der <i>sqr⁻</i> - Mutante <i>Rb. capsulatus</i> F14	37
5.3.1.2. Untersuchungen am isolierten Enzym	39
5.3.2. Val300Asp	42
5.3.3. His131Ala und His196Ala	45
5.3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der sequenzspezifischen Mutagenese	49

5.4.	Bestimmung des Schwefelprodukts der SQR-Reaktion	50
5.4.1.	Stöchiometrie der SQR-Reaktion	50
5.4.2.	Photometrische Polysulfidbestimmung	51
5.4.3.	Produktanalyse mit HPLC	53
5.4.4.	Einsatz von Na ₂ ³⁵ S als Substrat	54
6.	Diskussion	57
6.1.	Heterologe Expression und Reinigung der SQR aus <i>Rb. capsulatus</i>	57
6.2.	Eigenschaften der heterolog exprimierten SQR aus <i>Rb. capsulatus</i>	58
6.2.1.	Spezifische Aktivität	58
6.2.2.	Substrataffinität	59
6.2.3.	Die prosthetische Gruppe FAD	59
6.2.4.	Fluoreszenzeigenschaften	61
6.2.5.	Isoelektrischer Punkt und pH-Abhängigkeit der Reaktion	61
6.2.6.	Temperaturabhängigkeit und Stabilität	62
6.2.7.	Redoxeeigenschaften	64
6.3.	CD-Spektroskopie und Struktur der SQR	67
6.4.	Mechanismus der SQR-Reaktion	71
6.4.1.	Das Schwefelprodukt der SQR-Reaktion	71
6.4.2.	Die reduktive Halbreaktion	74
6.4.3.	Die oxidative Halbreaktion	79
7.	Ausblick	83
8.	Material und Methoden	85
8.1.	Material	85
8.1.1.	Organismen	85
8.1.2.	Plasmide	85
8.1.3.	Chemikalien	86
8.1.4.	Medien	86
8.1.4.1.	<i>E. coli</i> : Luria Broth (LB)	86
8.1.4.2.	<i>Rb. capsulatus</i> : RCV-Medium und Minimal-Medium	87
8.1.4.3.	PY-Medium	87
8.1.4.4.	Agarplatten	87
8.1.4.5.	Antibiotika	87
8.2.	Molekularbiologische Methoden	88
8.2.1.	Standard-Methoden	88
8.2.1.1.	Plasmidisolierung, Restriktionsverdau, Agarose-Gele, Ligationen und DNA-Gelextraktion	88
8.2.1.2.	CaCl ₂ -Transformation von <i>E. coli</i>	88
8.2.1.3.	Elektroporation von <i>E. coli</i>	88
8.2.1.4.	Herstellung von Glycerinkulturen	89
8.2.1.5.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	89
8.2.2.	Konjugation von <i>Rb. capsulatus</i> mit <i>E. coli</i>	89
8.2.3.	Heterologe Expression des <i>sqr</i> -Gens aus <i>Rb. capsulatus</i> in <i>E. coli</i>	90
8.2.3.1.	Konstruktion des Expressionsvektors pTHSQR	90
8.2.3.2.	Induktion der Expression	90
8.2.4.	Sequenzspezifische Mutagenese	91

8.2.4.1.	Grundlagen	91
8.2.4.2.	Mutagenese	91
8.2.4.3.	Klonierung der Mutationskonstrukte	92
8.3.	Biochemische Methoden	94
8.3.1.	Wachstum von <i>Rb. capsulatus</i>	94
8.3.2.	Bestimmung der Sulfidkonzentration in wässrigen Lösungen	94
8.3.3.	Isolierung der heterolog exprimierten SQR aus <i>E. coli</i>	94
8.3.4.	Proteinbestimmung	95
8.3.5.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	96
8.3.6.	Bestimmung des FAD-Gehalts	96
8.3.6.1.	Extraktion von Flavin aus Flavoproteinen	96
8.3.6.2.	FAD-Bestimmung mit der D-Aminosäure-Oxidase	96
8.3.6.3.	Fluorimetrische FAD-Bestimmung	97
8.3.7.	Bestimmung der SQR-Aktivität	97
8.3.8.	Detektion verschiedener Schwefelspezies durch HPLC	98
8.3.9.	Molekularsiebsäule Sephadex G-25	99
8.3.10.	Isoelektrische Fokussierung mit einer Chromatofokussing-Säule	99
8.3.11.	Fluoreszenzspektroskopie	99
8.3.12.	Redoxtitration	99
8.3.13.	Circular Dichroismus-Spektroskopie	101
8.4.	Computergestützte Berechnungen	102
8.4.1.	Sequenzanalyse	102
8.4.2.	Auswertung von CD-Spektren	102
8.4.3.	Strukturmodellierung	102
9.	Literatur	103

2. Abkürzungen

A.	<i>Aquifex</i>
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Asp	Aspartat
BCA	Bicinchoninsäure
BisTris	Bis[2-hydroxyethyl]iminotris[hydroxymethyl]methan
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
CD	Circular Dichroismus
Cm	Chloramphenicol
cmc	Kritische Mizellarkonzentration
Cys	Cystein
d	Tag
D	Differenz
Da	Dalton
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>
ϵ	Extinktionskoeffizient
ebd.	ebendort
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ET	Elektronentransport
FAD	Flavinadenindinukleotid
FCC	Flavocytochrom <i>c</i>
FeS	Eisen-Schwefel-Zentrum
Fl	Flavin
GR	Glutathion Reduktase
h	Stunde
His	Histidin
HPLC	High performance liquid chromatography
IEP	Isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalaktosid
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
l	Liter
λ	Wellenlänge
LipDH	Lipoamid-Dehydrogenase
Leu	Leucin
M	mol / Liter
m	Milli
μ	Mikro
MCS	multiple cloning site
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mM	Millimol / Liter
μ M	Mikromol / Liter
MR	Mercuri Reduktase
MW	Molekulargewicht
N	Normal
n	Stoffmenge

Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic acid
nm	Nanometer
<i>O.</i>	<i>Oscillatoria</i>
OD	optische Dichte
<i>P.</i>	<i>Paracoccus</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>Rb.</i>	<i>Rhodobacter</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
Sm	Streptomycin
Spc	Spectinomycin
SQR	Sulfid-Chinon Reduktase
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylendiamin
TRR	Thioredoxin Reduktase
U	Einheit der SQR-Aktivität: 1 U = 1 $\mu\text{mol dUQH}_2$ / min
ÜN	über Nacht
UZ	Ultrazentrifuge
Val	Valin
wt	Wildtyp
% (v/v)	ml pro 100 ml
% (w/v)	g pro 100 ml

3. Zusammenfassung

Biologische Oxidation von Sulfid ist eine in allen drei Domänen des Lebens stattfindende Reaktion. In den letzten Jahren legten verschiedene Hinweise den Schluß nahe, daß die Sulfid-Chinon Reduktase zumindest in Bakterien das für diese Reaktion entscheidende Enzym ist. Aus zwei Cyanobakterien und dem Proteobakterium *Rhodobacter capsulatus* wurde das Protein isoliert und kloniert. Es handelt sich hierbei um ein an die Cytoplasmamembran gebundenes Flavoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa, das in seiner aktiven Form wahrscheinlich als Dimer vorliegt. Das Vorkommen der SQR wurde anhand von Aktivitätsmessungen und/oder homologen Gensequenzen bei weiteren Gruppen von Bakterien wie den *Chlorobiaceae* und dem hyperthermophilen Bakterium *Aquifex aeolicus*, der ersten Abzweigung innerhalb des bakteriellen Stammbaums, nachgewiesen, so daß die SQR als ein phylogenetisch früh entstandenes Enzym betrachtet wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die SQR aus *Rhodobacter capsulatus* N-terminal mit einer Markierung aus 6 Histidinen und der Spaltsequenz für die Protease Enterokinase (Asp₄Lys) modifiziert, heterolog in *E. coli* exprimiert und zur Homogenität gereinigt. Die Eigenschaften des isolierten Enzyms waren weitgehend identisch mit denen des nativen Proteins aus *Rhodobacter capsulatus*. Für den Aktivitätstest der sulfidabhängigen Reduktion von Chinon wurde der Differenz-Extinktionskoeffizient für Decylubichinon $\epsilon_{275-300}$ mit $12,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt, außerdem wurden Limitationen der Versuchsbedingungen bzgl. Substrat- und Detergenzkonzentration untersucht. Die spezifische Aktivität des heterolog exprimierten und gereinigten Proteins war aufgrund der vereinfachten Reinigungsmethode deutlich höher als die des isolierten nativen Proteins. Die Substrataffinität bzgl. Sulfid und Chinon war geringfügig kleiner mit K_M -Werten von 5 bzw. 3 μM . Durch Extraktion von FAD, der prosthetischen Gruppe der SQR, wurde der vermutete nicht-kovalente Bindungscharakter zwischen Protein und FAD bestätigt, quantitative FAD-Bestimmungen zeigten einen Besetzungsgrad zwischen 5 und 25 % bezogen auf das SQR-Monomer. Die Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert ergab mit einem Optimum bei pH 6,7 und einem zweiten kleineren Optimum bei pH 5,0 ein weitgehend identisches Verhalten wie für die native SQR. Durch Chromatofokussing konnte der Isoelektrische Punkt auf 6,2 bestimmt werden. Auf die Fluoreszenzeigenschaften der SQR zeigte der His-Tag keine Auswirkungen. Durch Auswertung des CD-Spektrums wurden Sekundärstrukturanteile berechnet, die neben der funktionellen Zugehörigkeit auch für eine strukturelle Zugehörigkeit der SQR zur Disulfid-Oxidoreduktase-Familie der Flavoproteine sprechen. Die Temperaturabhängigkeit der SQR-Aktivität und der Stabilität zeigte ein für Proteine aus mesophilen Organismen typisches Verhalten. Darüberhinaus wurde die Inaktivierung des Enzyms bei Belichtung aufgrund des photodynamischen Effekts des Flavins untersucht. Die Redox titration der SQR zeigte, daß es sich um eine 2 Elektronen-Übertragung ohne Stabilisierung eines Semichinon-Zwischenprodukts handelt, das Mittelpunktspotential liegt mit 186 mV im äußersten, positiven Bereich von Flavoproteinen.

Durch gerichtete Mutagenese wurden die drei in allen SQR-Sequenzen konservierten Cysteine gegen Serin ausgetauscht (Cys127Ser, Cys159Ser und Cys353Ser). Alle drei resultierenden Proteine zeigten beinahe vollständige Inaktivierung. Durch Fluoreszenzspektroskopie wurde gezeigt, daß in allen drei Fällen die reduktive Halbreaktion, die die sulfidabhängige Reduktion der SQR umfaßt, inhibiert ist. Der Austausch eines Valins in der dritten Flavin-bindenden Domäne gegen Aspartat (Val300Asp) führte zu einer Erhöhung des K_M -Werts für Sulfid von 5 μM auf über 400 μM , auch die Affinität für Decylubichinon und die spezifische Aktivität waren deutlich verringert. Zwei in stark konservierten Bereichen der SQR gelegene Histidine waren aufgrund von Homologievergleichen als Kandidaten für Chinon-Bindedomänen betrachtet worden. Der Austausch dieser Histidine gegen Alanin führte jedoch zu keiner Änderung der Affinität für Chinon, die Abhängigkeit der Reaktion vom pH-Wert war aber bei der SQR-His131Ala drastisch und bei His196Ala leicht verändert.

Mit verschiedenen Methoden wurde das Schwefelprodukt der SQR-Reaktion untersucht. Während die Stöchiometrie der Reaktion ein Schwefelprodukt der Oxidationsstufe 0 nahelegte, war durch HPLC-Messungen kein Elementarschwefel, aber eine intermediäre Zunahme von Polysulfid nachweisbar. Auch durch spektroskopische Methoden konnte eine Zunahme der Polysulfidkonzentration beobachtet werden. Darüberhinaus wurde das Schicksal des Schwefelprodukts durch den Einsatz von Na_2^{35}S verfolgt. Das Fehlen von Radioaktivität in der Chloroformphase nach Extraktion und der Verbleib der Radioaktivität in der wässrigen Phase legten ebenfalls wasserlösliches Polysulfid als Reaktionsprodukt nahe. Weiterhin konnte kein spezifisches kovalentes Schwefelprodukt am Protein nachgewiesen werden, was Implikationen für den Mechanismus der Bildung des Polysulfids beinhaltet.

Auf Basis der gewonnenen Daten wurden Reaktionsmechanismen für die beiden Halbreaktionen der SQR, die sulfidabhängige Reduktion und die chinonabhängige Oxidation des Enzyms, und für das Schicksal des oxidierten Sulfids formuliert.

4. Einleitung

4.1. Biologische Umwandlung von Schwefelverbindungen

Mit einem Anteil von 1 % an der Trockenmasse gehört der Schwefel zur Gruppe der 8 am häufigsten in lebenden Organismen vorkommenden Elementen. In der Zelle liegt der Schwefel hauptsächlich in Form schwefelhaltiger Aminosäuren vor. Bei deren Abbau wird der Schwefel in einem Desulfurylierung genannten Prozess als H_2S wieder freigesetzt. Neben der assimilatorischen Reduktion von Sulfat zur in Proteinen vorkommenden Thiolform durch Prokaryoten und Pflanzen können Mikroorganismen oxidierte Schwefelverbindungen wie Sulfat, S^0 -Schwefel oder Polysulfid auch dissimilatorisch als eine Form der anaeroben Atmung reduzieren, meist bis zur Stufe des Sulfids¹. Umgekehrt können reduzierte Schwefelverbindungen wie Sulfid, Elementarschwefel oder Thiosulfat auch als Elektronendonoren genutzt werden, da ihr Redoxpotential hinreichend negativ ist, daß bei der Oxidation Energie gewonnen werden kann. Diese den Schwefel beinhaltende Vielzahl von Stoffwechselwegen wird auch als Redoxkreislauf des Schwefels bezeichnet (Madigan et al., 2001).

4.1.1. Mikrobielle Oxidation von Sulfid

Sulfid, die am höchsten reduzierte Form des anorganischen Schwefels, kommt v.a. in heißen Quellen als Folge geologischer Aktivität wie auch in Sedimenten vor, wo es von Sulfat-reduzierenden Bakterien gebildet wird (Jannasch, 1989; Trudinger, 1992). Hauptsächlich aus dem Grund, daß Sulfid an die Cytochrom-Oxidase bindet und damit die aerobe Atmungskette blockiert, ist es für die meisten Organismen höchst toxisch (National Research Council, 1979). Nichtsdestoweniger ist eine Vielzahl von chemotrophen (Kelly et al., 1997) und phototrophen Bakterien (Brune, 1995) in der Lage, autotroph unter Verwendung von Sulfid als Elektronenquelle zu wachsen. Neben den Bakterien können auch Vertreter der Archaeen Sulfid oxidieren (Stetter, 1996).

Abb. 4.1. (S. 11) und **Abb. 4.2.** (S. 12) stellen den sulfidabhängigen Elektronentransport am Beispiel der Proteobakterien dar. Dabei wird deutlich, daß Sulfid grundsätzlich an zwei Stellen in die Elektronentransportkette eingespeist werden kann, auf der Ebene des Chinon-Pools durch eine Sulfid:Chinon Oxidoreduktase (Sulfid-Chinon Reduktase, SQR) oder auf der Ebene des Cytochrom *c* durch eine Sulfid: Cytochrom *c* Oxidoreduktase (Flavocytochrom *c*, FCC). In beiden Fällen ist Reduktion von NAD^+ mit den Elektronen des Sulfids nur unter Aufwendung von Energie durch den membrangebundenen Elektronentransport (ET) möglich. Hierbei wird NAD^+ mit Hydrochinon durch eine reverse NADH-Dehydrogenase reduziert, die durch den elektrochemischen Protonengradienten getrieben wird.

¹ Mit Sulfid werden in der vorliegenden Arbeit die bei biologisch relevantem pH vorliegenden Formen H_2S und HS^- bezeichnet ($\text{pK}_1(\text{H}_2\text{S}) = 7,0$ (Steudel, 1996b)).

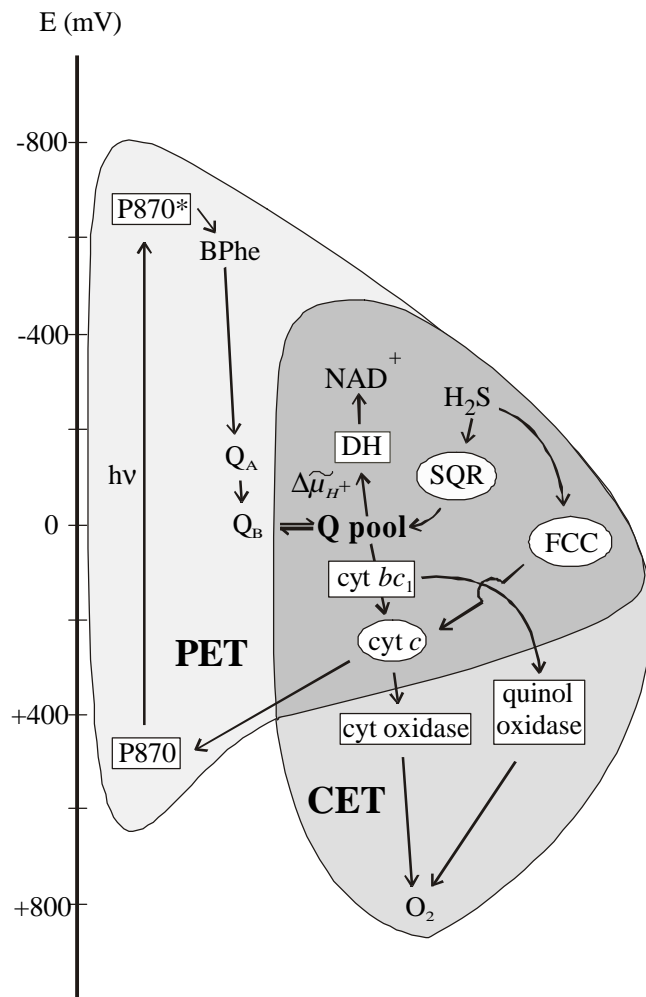


Abb. 4.1. Redoxschema des photo- und chemotrophen Elektronentransports in Proteobakterien. PET, photosynthetischer Elektronentransport; CET, chemotropher Elektronentransport; P870, special pair Chlorophyll; BPhe Bacteriopheophytin, QA und QB, Chinon-Bindestellen des Reaktionszentrums; DH, NADH-Dehydrogenase; *cyt bc₁*, Cytochrom *bc₁*-Komplex; *cyt c*, Cytochrom *c*; *cyt oxidase*, Cytochrom-Oxidase.

Bei photosynthetischen Proteobakterien wird, wie aus **Abb. 4.1.** und **Abb. 4.2.A** (S. 12) ersichtlich, der Protonengradient durch einen lichtgetriebenen cyclischen ET zwischen Chinon-Pool, Cytochrom *bc₁*-Komplex, Cytochrom *c* und dem bakteriellen Reaktionszentrum errichtet. Während es unter Starklichtbedingungen keine Rolle spielt, auf welcher Ebene die Elektronen aus Sulfid eingespeist werden, wird dies bei Bedingungen entscheidend, bei denen Licht limitierend ist. Bei sulfidabhängiger Reduktion des Chinonpools durch die SQR kann hierbei mehr Energie gewonnen werden, da der Cytochrom *bc₁*-Komplex hier bereits zur Errichtung des Protonengradienten beitragen kann. Dieser Schritt entfällt bei Sulfidoxidation durch FCC.

Bei chemolithotrophem Wachstum wird die Energie zur Errichtung des Protonengradienten und in der Folge zur chinolabhängigen NAD^+ -Reduktion durch Oxidation des anorganischen Elektronendonors mit einem terminalen Akzeptor wie z.B. Sauerstoff gewonnen (s. **Abb. 4.1.**, **Abb. 4.2.B**). Während die Effizienz von SQR und FCC in Gegenwart ausreichender Sauerstoffkonzentrationen keine Rolle spielt, liefert auch hier die SQR unter Bedingungen, bei denen Sauerstoff limitierend ist, mehr Energie als die Reaktion mit FCC.

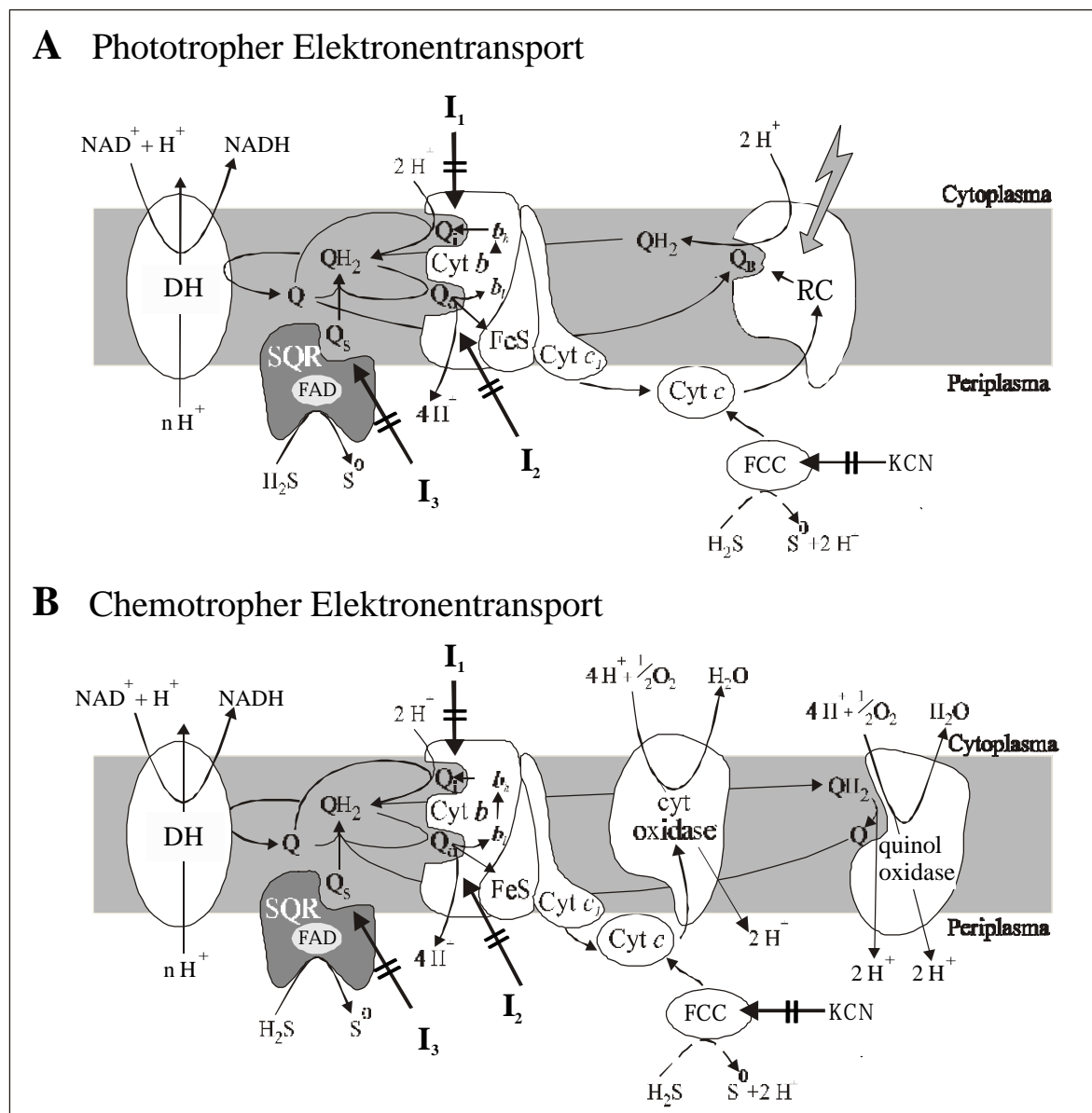


Abb. 4.2. Topographie des Elektronentransports in der Cytoplasmamembran von Proteobakterien. **A** Phototropher Elektronentransport. **B** Chemotropher Elektronentransport. Die Bindestellen der chinonanalogen Hemmstoffe am Cytochrom *bc*₁-Komplex und an der SQR sind bezeichnet als *I*₁, *I*₂ und *I*₃. Inhibitoren an *I*₁ sind Antimycin A, Aurachin C, NQNO und HQNO, an *I*₂ Myxothiazol und Stigmatellin und an *I*₃ Myxothiazol, Antimycin A, Stigmatellin, Aurachin C, NQNO, HQNO und KCN (Von Jagow und Link, 1986; Hauska et al., 1996). (DH, NADH-Dehydrogenase; Cyt *b*, FeS und Cyt *c*₁ bezeichnen die Cytochrom *b*-Untereinheit, das Rieske Eisenschwefel-Zentrum und die Cytochrom *c*₁-Untereinheit des Cytochrom *bc*₁-Komplexes; *b*_h und *b*_l, High und Low Potential-Häm von Cytochrom *b*; *Q*_i und *Q*_o, Chinon-Reduktions- und Chinon-Oxidationsstelle des *bc*₁-Komplexes; *Q*_s, Chinon-Bindestelle der SQR; *Q*_B, Chinon-Reduktionsstelle des Photosystems; RC, Photosynthetisches Reaktionszentrum; cyt *c*, Cytochrom *c*).

Flavocytochrom *c* (FCC) ist ein lösliches, periplasmatisches oder membrangebundenes Protein, bestehend aus einer Flavin-bindenden und einer Cytochrom-Untereinheit, und überträgt *in vitro* die Elektronen aus der Sulfidoxidation auf Cytochrom *c* (Cusanovich et al., 1991; Visser et al., 1997). Das Protein wurde bzgl. seines Reaktionsmechanismus eingehend untersucht (Tollin et al., 1982;

Cusanovich et al., 1985; Guo et al., 1990; Meyer et al., 1991), die Röntgenkristallstruktur wurde aufgeklärt (Chen et al., 1994; Van Driessche et al., 1996). Obwohl FCC bei 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 Bakterien nicht gefunden wurde. Darüberhinaus zeigte die Unterbrechung des Gens für Flavocytochrom *c* in *Allochromatium vinosum* keinen Effekt auf die Fähigkeit zur Sulfidoxidation (Reinartz et al., 1998). Da Flavocytochrom *c* ausschließlich bei Organismen nachgewiesen werden konnte, die neben der Sulfidoxidation auch Thiosulfat oxidieren können, wird vermutet, daß Flavocytochrom *c* *in vivo* nicht für die Oxidation von Sulfid, sondern für die Oxidation von Thiosulfat und Sulfit zuständig ist (Brune, 1995; Van Driessche et al., 1996, Friedrich, 1998).

Einspeisung der Elektronen von Sulfid auf der Ebene des Chinon-Pools durch eine Sulfid:Chinon Oxidoreduktase (SQR; E.C. 1.8.5.1) wurde in den letzten Jahren eingehend untersucht. SQR ist ein Flavoprotein aus der Familie der Disulfid-Oxidoreduktasen (Arieli et al., 1994; Schütz et al., 1997). Enzymaktivität und/oder das verantwortliche Gen wurden bei einer Reihe Bakterien nachgewiesen (s. **Abb. 4.4.**, S. 20). Durch Inaktivierung des Gens in *Rb. capsulatus* wurde gezeigt, daß SQR essentiell für das Wachstum dieses Organismus auf Sulfid ist (Schütz et al., 1999). Die weite Verbreitung innerhalb der Prokaryoten (s. **Abb.4.4.**, S. 20) läßt den Schluß zu, daß dieses Enzym bereits sehr früh in der Evolution entstanden sein könnte (Griesbeck et al., 2000).

4.1.2. Sulfidoxidation bei Eukaryoten

Die Fähigkeit zur Oxidation von Sulfid ist nicht auf Prokaryoten beschränkt. Bei einer Reihe von Eukaryoten, die zu evolutiv entfernten Gruppen wie Anneliden, Mollusken und Vertebraten gehören, wurde eine Kopplung der ATP-Synthese an die Oxidation von Sulfid nachgewiesen (Grieshaber und Völkel, 1998; Parrino et al., 2000). Während in Mitochondrien der Muschel *Solemya reidi* die Elektronen auf der Ebene von Cytochrom *c* in den Elektronentransport eingespeist werden, wurde für den Wattwurm *Arenicola marina* sulfidabhängiger Elektronentransport über den Cytochrom *bc*₁-Komplex nachgewiesen (Grieshaber und Völkel, 1998). Bei niedrigen Sulfidkonzentrationen werden die Elektronen hier über Cytochrom *c* und die sulfidsensitive Cytochrom-Oxidase auf Sauerstoff übertragen. Bei hohen Sulfidkonzentrationen dagegen scheinen die Elektronen über eine sulfidinsensitive, alternative Oxidase auf Sauerstoff übertragen zu werden, die als Anpassung an das Leben in sulfidreicher Umgebung verstanden wird (Völkel und Grieshaber, 1996). Der erste Schritt der Sulfidoxidation in diesem Organismus wird möglicherweise durch SQR katalysiert, wie vorläufige Ergebnisse zur SQR-Aktivität in Mitochondrien von *A. marina* zeigen (M. Klein, M. Schütz, G. Hauska und M.K. Grieshaber, persönliche Mitteilung). Die Beteiligung des Cytochrom *bc*₁-Komplexes am sulfidabhängigen Elektronentransport wurde auch in den Mitochondrien der Kiemen bei der Muschel *Geukensia demissa* nachgewiesen (Parrino et al., 2000).

In jüngster Zeit konnte Sulfidoxidation auch in Geweben von Organismen nachgewiesen werden, die nicht spezifisch auf das Leben in sulfidreicher Umgebung angepaßt sind. Ein Beispiel dafür ist das Darmgewebe der Ratte, das in der Lage ist, das von symbiontischen Mikroorganismen ausgeschiedene H_2S zu entgiften (Furne et al., 2001). In Mitochondrien der Leber von Hühnern wurde die Kopplung der ATP-Synthese an die Oxidation von Sulfid gezeigt (Yong und Searcy, 2001). Ein an der Sulfidoxidation in Mitochondrien möglicherweise beteiligtes Enzym wurde in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* identifiziert (Vande Weghe und Ow, 1999; s. Abschnitt 4.2.4., S. 19f). Diese Ergebnisse sind im Licht der Endosymbiontentheorie nicht überraschend, da bei den Proteobakterien, den freilebenden Verwandten der Mitochondrien (Madigan et al., 2001), Sulfidoxidation weit verbreitet ist (Brune, 1995; Friedrich, 1998). Die Fähigkeit zur Sulfidoxidation ist offensichtlich nach dem Übergang zur Endosymbiose von den Mitochondrien beibehalten worden.

4.2. Die Sulfid-Chinon Reduktase (SQR)

4.2.1. Entdeckung der SQR

Beteiligung des Chinon-Pools an der sulfidabhängigen Reduktion von $NADP^+$ wurde zuerst in Membranen des Grünen Schwefelbakteriums *Chlorobium thiosulfatophilum* nachgewiesen (Knaff und Buchanan, 1975). Es zeigte sich, daß diese Reaktion sensitiv gegenüber chinonanaloge Hemmstoffen des Cytochrom *bc*-Komplexes war. In der Folge zeigten Brune und Trüper (1986), daß auch in Membranen des Schwefelfreien Purpurbakteriums *Rhodobacter sulfidophilus* die sulfidabhängige NAD^+ -Reduktion im Licht durch chinonanaloge Inhibitoren hemmbar ist. Weiterhin beobachteten sie im Dunkeln sulfidabhängige Reduktion von Chinon.

Das Cyanobakterium *Oscillatoria limnetica* ist in der Lage, in Gegenwart von Sulfid von oxygener Photosynthese auf anoxygene Photosynthese mit Sulfid als Elektronendonator umzuschalten (Cohen et al., 1975). Die sulfidabhängige Errichtung eines Protonengradienten über die Thylakoidmembran konnte beobachtet werden, wobei der Gradient wiederum durch Inhibitoren des Cytochrom *b₆f*- und Cytochrom *bc*-Komplexes gehemmt wurde. Mit Hilfe eines Aktivitätstests, bei dem die sulfidabhängige Reduktion extern zugegebenen Chinons gemessen wurde (Arieli et al., 1991), konnte aus *O. limnetica* erstmalig eine Sulfid-Chinon Reduktase gereinigt und charakterisiert werden (Arieli et al., 1994). Membrangebundene SQR-Aktivität und Beteiligung des Chinon-Pools und des Cytochrom *b₆f* bzw. Cytochrom *bc*-Komplexes konnten seither noch bei einer Reihe photo- und chemotropher Bakterien nachgewiesen werden (s. **Abb. 4.4.**, S. 20; Griesbeck et al., 2000). Aus dem Schwefelfreien Purpurbakterium *Rhodobacter capsulatus* wurde die SQR gereinigt, das entsprechende Gen wurde kloniert und heterolog in *E. coli* exprimiert (Schütz et al., 1997).

4.2.2. Eigenschaften der SQR

4.2.2.1. Eigenschaften des Proteins

Bei den beiden bisher isolierten SQR-Proteinen von *Oscillatoria limnetica* (Arieli et al., 1994) und *Rb. capsulatus* (Schütz et al., 1997) handelt es sich um Polypeptide mit einem apparenten Molekulargewicht von 55-57 kDa in der SDS-PAGE. Die Fluoreszenzspektren zeigen mit Anregungsmaxima bei ca. 280, 375 und 450 nm und einem Emissionsmaximum bei ca. 520 nm typische Merkmale von Flavoproteinen. Zugabe von Sulfid führt konzentrationsabhängig zu einer Verminderung der Fluoreszenz. Die ermittelten K_M -Werte für Sulfid und Decylubichinon (*Rb. capsulatus*) bzw. Plastochinon (*O. limnetica*) liegen im mikromolaren Bereich, durch chinonanalogue Hemmstoffe in mikromolaren Konzentrationen werden die Enzyme gehemmt. Entsprechende Ergebnisse fanden sich auch für andere in Membranumgebung untersuchte SQR-Aktivitäten von *Aquifex aeolicus*, *Paracoccus denitrificans*, *Allochromatium vinosum* und *Chlorobium limicola* (Griesbeck et al., 2000). Auffällig waren in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von Untersuchungen zur SQR-Aktivität in Membranen des hyperthermophilen Bakteriums *Aquifex aeolicus*. Diese zeigten eine sehr hohe spezifische Aktivität und ein Aktivitätsoptimum bei über 80°C (Nübel et al., 2000).

Weitergehende Untersuchungen an der SQR von *Rb. capsulatus* zeigten, daß das Protein an die periplasmatische Seite der Cytoplasmamembran gebunden vorliegt (Schütz et al., 1999). Experimente mit Molekularsiebsäule, Ultrafiltration und Nativgel legen außerdem den Schluß nahe, daß es sich bei der SQR in ihrer aktiven Form um ein nicht-kovalent verknüpftes Homodimer handelt (Schütz et al., 1997; Schödl, 2000).

4.2.2.2. *sqr*-Gene und Aminosäuresequenzen

Das *sqr*-Gen aus *Rb. capsulatus* konnte als erstes *sqr*-Gen kloniert und sequenziert werden (Schütz et al., 1997). Es kodiert für ein aus 427 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 47 kDa. Inaktivierung des Gens in *Rb. capsulatus* und anschließende Komplementationsexperimente zeigten, daß das *sqr*-Gen essentiell für das Wachstum von *Rb. capsulatus* auf Sulfid ist (Schütz et al., 1999). In der Folge konnten auch die *sqr*-Gene der Cyanobakterien *Oscillatoria limnetica* und *Aphanothece halophytica* kloniert und sequenziert werden (Bronstein et al., 2000). Anhand dieser Daten wurden eine Reihe weiterer Gensequenzen von verschiedenen chemo- und phototrophen Bakterien in Datenbanken identifiziert, die für Proteine mit hoher Homologie zu den SQR-Sequenzen kodieren (s. **Abb. 4.3.**, S. 17f; **Tab. 4.1.**, S. 16).

Sequenzvergleiche zeigten, daß es sich bei der SQR um ein Flavoprotein der Disulfid-Oxidoreduktase-Familie (auch Glutathion-Reduktase-Familie genannt) handelt, zu der neben Flavocytochrom *c* auch die Glutathion Reduktase, die Lipoamid-Dehydrogenase, die Thioredoxin Reduktase und die Mercuri Reduktase gehören. Obwohl die Identität zwischen der SQR und

anderen Mitgliedern dieser Familie nur wenig über 20 % beträgt (z.B. 22 - 25 % zwischen der SQR und FCC (s. **Tab. 4.1.**, S. 16), sind die drei Flavin-bindenden Domänen in der SQR deutlich konserviert. Auffällig ist hierbei allerdings in der dritten Flavin-bindenden Domäne die Abwesenheit eines Aspartatrests bei allen SQR-Sequenzen. Dieses Aspartat ist bei den anderen Vertretern der Glutathion-Reduktase-Familie konserviert (Asp324 in FCC). An dieser Stelle findet sich in der SQR ein Valin-Rest, Val300 bei der SQR von *Rb. capsulatus*, bei *Thiobacillus ferrooxidans* ein Isoleucin. **Abb. 4.3.** (S. 17f) zeigt ein Alignment aller bisher bekannten SQR-Sequenzen mit FCC. Die FAD-Bindedomänen sind dabei mit durchgezogenen Linien und römischen Ziffern gekennzeichnet.

Daneben sind sechs Bereiche erkennbar, die innerhalb der SQR-Sequenzen stark konserviert sind, aber keine Ähnlichkeit zu FCC aufweisen. Diese sechs als SQR-Fingerprint betrachteten Regionen sind in **Abb. 4.3.** (S. 17f) mit gestrichelten Linien und arabischen Ziffern bezeichnet. Innerhalb dieser Fingerprint-Bereiche finden sich 3 Cysteine und 2 Histidine, die in allen SQR-Sequenzen konserviert sind und die funktionelle Bedeutung besitzen könnten (Griesbeck et al., 2000). Insgesamt liegt die Identität zwischen allen SQR-Sequenzen zwischen 38 und 64 % (s. **Tab. 4.1.**). Überraschend hierbei ist v.a. die starke Homologie der SQR von *Aquifex aeolicus* zu den anderen Sequenzen, da dieser hyperthermophile Organismus im 16S-rRNA-Stammbaum der Bakterien die tiefste Abzweigung darstellt (Burggraf et al., 1992) (s. **Abb. 4.4.**, S. 20).

Tab. 4.1. Identität und Ähnlichkeit der SQR-Peptidsequenzen untereinander und im Vergleich zur Flavoproteinuntereinheit von FCC. Die Prozentzahlen geben Identität (oberer Wert) und Ähnlichkeit (unterer Wert) an. Die Werte wurden mit BLASTP 2.0.9 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/wblast2.cgi>) errechnet. Quellen der Sequenzen: s. **Abb. 4.3.**, S. 17f.

<i>R. capsulatus</i>	100 100							
<i>S. putrefaciens</i>	46 64	100 100						
<i>T. ferrooxidans</i>	46 56	49 65	100 100					
<i>A. aeolicus</i>	38 57	39 53	40 66	100 100				
<i>O. limnetica</i>	42 61	42 56	38 66	44 61	100 100			
<i>Anabaena 7120</i>	42 61	41 57	39 58	40 57	64 79	100 100		
<i>A. halophytica</i>	40 59	42 59	37 55	40 56	58 74	59 75	100 100	
<i>FCC (A. vinosum)</i>	23 38	24 36	23 36	24 40	25 38	22 36	25 38	100 100

		I	
		:: :*. * . * * : : : . : .	
<i>R. caps.</i>	-----MAHIVVLGAGLGGAIMAYELREQVRKEDK		29
<i>S. putre.</i>	-----MKKIIVIGAGLGGVSVAFELKQRLPSDCE		29
<i>T. ferro.</i>	-----MAHVVLGAGTGGMPAAYEMKEALGSGHE		29
<i>A. aeol.</i>	-----MAKHVVVIGGGVGGIATAYNLRNLMP-DLK		29
<i>O. lim.</i>	-----MAHVAVIGAGLAGLPTAYELRHILPRQHR		29
<i>A. 7120</i>	-----MAHIVIVGAGLGGLPAYELRHILPKQHQ		29
<i>A. halo.</i>	-----MAHIVIVGGGFGGLSAAAYELKHLHGKHK		29
FCC	MTLNRDFIKTSGAAVAAVGILGFPHLAFGAGRKVVVVGGGTGGATAAKYIKLADP-SIE		59
		:: :*. * . * * : : .	
		: : * : : * * : * : . . : : * : . : . : :	
<i>R. caps.</i>	VTVITKDPMYHFVPSNPWVAVGWRDRKEITVDLAPTMARKNIDFIPVAAKRLHPAENRVE		89
<i>S. putre.</i>	IGVISEGTFDFQFVPSNPWVALGERTREDISLPIGTYLAKRKISYSGEGVTHIDPLNKKLT		89
<i>T. ferro.</i>	VTLISANDYFQFVPSNPWVGWGERDDIAFPIRHYVERKGIHFIAQSAEQIDAEAQNIT		89
<i>A. aeol.</i>	ITLISDRPYFGFTPAPPHLAMGWRKFEDISVPLAPLLPKFNIEFINEKAESIDPDANTVT		89
<i>O. lim.</i>	VTLISDKPNFTFTPSLPWVAFDLTPLERVQLDVGKLLKGRNIDWIHGKVNHIIDPENKTSV		89
<i>A. 7120</i>	VTVISETPYFTFIPSLPWVAMGLTSLESIQVSLQQRKQKGINWILGRVDYLNPNQNKIS		89
<i>A. halo.</i>	ITLISDETTFTFIPSLPWVAFNLRLEDVQLPLAPLLARQGINWQHGRVTGLDPNQKRVS		89
FCC	VTLIEPNTDYTYCYLSNEVIGDRKLESIKHGYDG-LRAHGIQVVHDSATGIDPDKKLVK		118
		: : * : : * : : . : . : : * : . : . : :	
		. . * * : : * . * . * * * * : : * * : : * : *	
<i>R. caps.</i>	LENGQSVSYDQIVIATGPELAFDEIEGFGP---EGHTQSICHIDHAEAAAGAFDRFCENP		146
<i>S. putre.</i>	LGDTTNNYDYLVICTGPKLAFENVPGSGP---EGFTQSICTIDHAEKAYECFQQLLAKP		146
<i>T. ferro.</i>	LADGNTVHYDYLMIATGPKLAFENVPGSDPH---EGPVQSICTVDHAERAFAEYQALLREP		147
<i>A. aeol.</i>	TQSGKKIEYDYLVIATGPKLVFG-AEQQ----EENSTSICTAEHALETQKKLQELYANP		143
<i>O. lim.</i>	AGE-QTLEYDYVVVATGPELATDAIAGLGPE--NGYTQSVCPNPHHALMAKEAWQKFLQDP		146
<i>A. 7120</i>	LGE-QSISYDYLIIATGAELALDAVAGLGPD---GYTQSVCPNPHHAIAKAFQAWQNFLAP		145
<i>A. halo.</i>	VGEDITFDYDYLVIITGASLAYHLMSGLGPE--EGYTQSVCPNAHHAEMARDAWDEFLENP		147
FCC	TAGGAEFGYDRCVVAPGIELIYDKIEGYSEEAALKPHAWKAGEQTALIRKQLEDMDAGG		178
		* * : : . * . * * * : : : : : : : :	
		-----2--∇-----	
		* * : : * * * * : : * : . * : : : * : * * * * * * * * : : * : :	
<i>R. caps.</i>	GPIIIGAAQGASCFCPAYEFTFILDTALRRKIRDKVP-MTFVVTSEPYVGHGLDGVGDT		205
<i>S. putre.</i>	GPVVVGALQGASCFCPAYEYVLSLESLLRKHKVRQHIPP-ITFVVTSEPYVGHMGLGGVGD		205
<i>T. ferro.</i>	GPIVIGAMAGASCFCPAYEYAMIVASDLKRRGMRDKIPSFITSEPYIGHLGIQVGD		207
<i>A. aeol.</i>	GPVVIGAI PGVSCFCPAYEFALMLHYELKRGIRYKVP-MTFITSEPYLGHFGVGGIGAS		202
<i>O. lim.</i>	GPLVVGAVPGASCFCPAYEFALLADYVLRKGMRRV-ITFVVTPEPYVGHGLGIGGMANS		205
<i>A. 7120</i>	GPLVVGALPKTSCLPAYEFTLLADYVLRKQGLREQVS-ITFVVTPEPYAGHLGIGGMANS		204
<i>A. halo.</i>	GPLLVGAVPGASCMPAYEFALLADYALRQEGKRDQVP-ITFISPEPYLGHGLGIGGMANS		206
FCC	TVVIAPPAAPFRCPPGPERASQVAYYLKAHKPKSKVIIILDSSQTFQSKQSQFSKG---W		234
		: : . * * * * * * * * : : : : : . . : : .	
		: : : : : . . . * * * * * :	
<i>R. caps.</i>	KGLLEGNLRDKHIKWMTS--TRIKRVEPGKMVVEEVTEDGTVKPEKELPFGYAMMLPAFR		263
<i>S. putre.</i>	KSLMEHEFRERSIKWICN--AKTTHFESGIAYVDELDRKGEVEFQHTLPFSLAMFLPPFK		263
<i>T. ferro.</i>	KGILTKGLKEEGIEAYTN--CKVTKVEDNKMYVTQVDEKGETIKEMVLPVKFGMMIPAFK		265
<i>A. aeol.</i>	KRLVEDLFAERNIDWIAN--VAVKAI EPDKVIYEDLNGN-----THEVPAKFTMFMP SFQ		255
<i>O. lim.</i>	AELVTDLLENKIRVLPN--TAVKEIHPEHMDLDSG-----EQLPFKYAMLLPPFR		254
<i>A. 7120</i>	AELVTKFMAERGVEVIEN--VAVTAIEANQIHLGNG-----RVLFPFAYSMLLPPFR		253
<i>A. halo.</i>	GKLVTELMKQRNIDWVEN--AEIAEIKEDHVKLTG-----REFPFNYSMFLPPFR		255
FCC	ERLYGFGTENAMIEWHPGPDASVVKVDGEMMVETAFG-----DEFKADVINLIPPQR		287
		: : : : : : * : :	

(Fortsetzung: s. S. 18)

	III	III
<i>R.caps.</i>	* : : : : : : : : : : : : : : : : *	**
<i>R.caps.</i>	GIKALMGI-EGLVNPR-GFVIVDQHQQNPTFKNVFVAVGVCVAIPVVGPTPVPCGVPKTG-	320
<i>S.putre.</i>	GSAATAAV-PELCNEK-GFVLDTDFQSPRYPEIYAAGVCVAVPPLENPQYRLAYPKQVL	321
<i>T.ferro.</i>	GVPVAVAGV-EGLCNPQ-GFVLVDEHQSRKKYANIFAAGIAIAIPVETTPVPTGAPKTG-	322
<i>A.aeol.</i>	GPEVVASAGDKVANPANKMVIIVNRCFQNPYKNIFFGVGVVTAIPPIEKTPIPTGVPKTG-	314
<i>O.lim.</i>	GPAFLREA-PELTNPK-GFVPVTNTYQHPKYESVYSAGVIVEINPPEKTPLPVGVPKTG-	311
A.7120	GPRFVRQV-PGLSNQD-GFIPVLPYRHPYASIVAVGVVVEIKPSEVTPLPLGVPKTG-	310
<i>A.halo.</i>	GAQFLKEV-PGLTDEK-GFLPVLDTYQHPDYPSIYSAGVITQLAAPEETEVEPLGAPKTG-	312
FCC	AGKIAQIA--GLTNDAGWCPVDIKTFESSIHKGIHVIGDACIANP-----MPKSG-	335
	. : : . . : . *↑ . **	
	-----4-----	--∇-5-----
<i>R.caps.</i>	* * * * . ** :	* : * : * : * : * . *
<i>R.caps.</i>	FMIESMVTATAHNIGRIVRG-LEPDEVGSWNAVCLADFGDKGIAFVAQPQIPP-----RN	374
<i>S.putre.</i>	FMIESMTTAVDNILANLKG-EPPQTHPTLNAICLADMGDKGAAFVALPQNPP-----RN	375
<i>T.ferro.</i>	YMIESMVSAAVHNKADLEGRKGEQTMGTWNAVCFADMGDRGAAFIALPQLKP-----RK	377
<i>A.aeol.</i>	MMIEQMAMAVAHNIVNDIRN-NPKYAPRLSAICIADFGEDAGFFFADPVIPP-----RE	368
<i>O.lim.</i>	QMTTEAMGMAAAHNIAIKLGVSKAKPVQPTLEAICIADFGDTGIVFVADPVLDPKGTTRR	371
A.7120	QMTTEAMGMAVAHNIAIELGVFSAPPVPTPLDAICFADFGNSGILFLANPVLPLDLATGKRR	370
<i>A.halo.</i>	QMTESMAMAVAHNIAARELGEINARPVKPSLEAICMADFGDTGIIFIAAPVVPDPSVGHRR	372
FCC	YSANSQGVAAAVALKKG--EEPGTPSYLNTCYSILAPAYGISVAAIYRPN----ADG	389
	: . . : : * : : . *	
	-----6-----	
<i>R.caps.</i>	* * . * . ** : * : * : *	. * : : :
<i>R.caps.</i>	VNWSSQGWVHWAKEGFERYFMHKLRRGTSE---TFYEKAAMKLLGIDKLVKAVKKG---	427
<i>S.putre.</i>	ANWTSMTKVVHVAKIAFEKYFLYKVRNGTSE---PIYEKYVLGSLGIHRTHGPK----	426
<i>T.ferro.</i>	VDVFAYGRWVHLAKVAFEKYFIRKMKMGVSEGCLRAFYEKVLFKMMGITRLK-----	429
<i>A.aeol.</i>	RVITKMGKWAHYFKTAFEKYFLWKVRNGNIAP---SFEEKVLEIFLKVHPIELCKDCEGA	425
<i>O.lim.</i>	RAITKRGKVVSWSKTAFETFFLSKMRFGTAV---PWFERWGLRFMGLSLVEPLDTRRET	427
A.7120	RAVALSGAWVTWAKAAAFERYFLAKMRFGTAV---PWFEKLALKLLGLSLVAPLAVK--SS	425
<i>A.halo.</i>	HATALRGLWVNWAKNAFEWYFLAKMRWGTAV---PWFEKLGLYLLRLTLVTPISSET-PT	427
FCC	SAIESVPDSSGGVTPVDAPDWLREREVQYAYS-----WYNNIVHDTFG-----	431
	: . : : : . :	
<i>R.caps.</i>	-----	427
<i>S.putre.</i>	-----	426
<i>T.ferro.</i>	-----	429
<i>A.aeol.</i>	PGSRC-----	430
<i>O.lim.</i>	GNQAFASKS-	436
A.7120	RNISQENY--	433
<i>A.halo.</i>	QQKDLTSIKG	437
FCC	-----	

Abb. 4.3. Alignment der SQR-Sequenzen und von FCC. Die SQR-Sequenzen sind von *Rhodobacter capsulatus* (*R.caps.*; Schütz et al., 1999), *Shewanella putrefaciens* (*S.putre.*; Bronstein et al., 2000), *Thiobacillus ferrooxidans* (*T.ferro.*; Nübel et al., 2000), *Aquifex aeolicus* (*A.aeol.*; Deckert et al., 1998), *Oscillatoria limnetica* (*O.lim.*; Bronstein et al., 2000), *Anabaena* ATCC 7120 (A.7120; Kazusa DNA Research Institute, <http://www.kazusa.or.jp>) und *Aphanothece halophytica* (*A.halo.*; Bronstein et al., 2000). Die Sequenz der Flavoproteinuntereinheit von Flavocytochrom *c* (FCC) ist von *Allochrochromatium vinosum* (Van Driessche et al., 1996). Da die N-terminale Präsequenz in der gezeigten Sequenz enthalten ist, sind die Numerierungen der Aminosäuren in der vorliegenden Arbeit jeweils um 30 höher als in der Originalarbeit. Die FAD-bindenden Domänen sind mit durchgezogenen Linien und römischen Ziffern gekennzeichnet, die SQR-typischen Bereiche mit gestrichelten Linien und arabischen Ziffern. Die drei Cysteine, die in allen SQR-Sequenzen konserviert sind, sind mit offenen Dreiecken markiert, die beiden konservierten Histidine mit Pfeilen oberhalb der Sequenzen und der Aspartat-Rest, der bei allen Flavoproteinen der Disulfid-Oxidoreduktase-Familie in der dritten Flavinbindedomäne vorliegt, aber nicht in der SQR, mit einem Pfeil unterhalb der Sequenzen. Identische Aminosäuren sind mit einem * gekennzeichnet, Doppelpunkt und Punkt zeigen hohe bzw. geringere Ähnlichkeit an. Diese Positionen sind für die SQR-Sequenzen oberhalb des Alignments angegeben und für SQR und FCC unterhalb.

4.2.3. Regulation der Expression der SQR bei *Rb. capsulatus*

Die Fähigkeit zur Oxidation von Sulfid ist in *Rb. capsulatus* ein induzierbarer Prozess, wie durch Wijbenga und Van Gernerden (1981) gezeigt werden konnte. Reporterstudien in unserem Labor wiesen nach Induktion durch Sulfid einen Anstieg der Expression der SQR nach (Schütz, 1997). Darüberhinaus wurde deutlich, daß der Anstieg in Gegenwart von Sauerstoff um ein Mehrfaches höher lag als unter anaeroben Bedingungen (Schütz, 1997; Griesbeck et al., 2000; Bathe, 2001). Aufgrund dieser Daten wurde ein Modell postuliert, nach dem der Redoxzustand des Chinonpools als Spiegel des metabolischen Zustands der Zelle die Expression der SQR beeinflusst (Griesbeck et al., 2000). Die Einspeisung von Elektronen von Sulfid in den Chinonpool würde nur stattfinden, solange im Chinonpool ein Verhältnis zugunsten oxidierten Chinons vorläge. Bei einer Überreduktion des Chinonpools würde der cyclische Elektronentransport zum Erliegen kommen, und ATP-Synthese und NAD⁺-Reduktion wären vermindert (Ferguson et al., 1987; McEwan, 1994).

4.2.4. Verbreitung der SQR

Abb. 4.4. (S. 20) zeigt das Vorkommen der SQR innerhalb des Reiches der Bakterien auf Basis von SQR-Aktivitäten und/oder Genen, die für Proteine mit hoher Homologie zu bekannten SQR-Sequenzen kodieren (s. Abschnitt 4.2.2.2., S. 15ff). Sowohl SQR-Aktivität als auch das entsprechende Gen wurden bisher bei den Cyanobakterien *Oscillatoria limnetica* und *Aphanothece halophytica* (Bronstein et al., 2000) sowie bei dem Nichtschwefel-Purpurbakterium *Rb. capsulatus* (Schütz et al., 1997) und dem hyperthermophilen Bakterium *Aquifex aeolicus* (Nübel et al., 2000) identifiziert. Gene mit hoher Homologie zur SQR wurden bei weiteren Proteobakterien (*Shewanella putrefaciens* und *Thiobacillus ferrooxidans*) und Cyanobakterien (*Anabaena* ATCC 7120) entdeckt. Bei weiteren Proteobakterien (*Allochromatium vinosum* (Reinartz et al., 1998), *Thiobacillus* sp.W5 (Visser et al., 1997) und *Paracoccus denitrificans* (Schütz et al., 1998)) konnte SQR-Aktivität nachgewiesen werden, darüberhinaus bei Grünen Schwefelbakterien (*Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* (Shahak et al., 1992) und *C. tepidum* (Klughammer et al., 1995)) und den *Chloroflexaceae* (Shahak et al., 1999). Aufgrund dieser weiten Verbreitung scheint es sich bei der SQR um ein evolutionär altes Enzym zu handeln, das bereits während einer sulfidhaltigen Uratmosphäre (Madigan et al., 2001) entwickelt worden sein könnte.

In der Spalthefe *Schizosaccaromyces pombe* wurde durch Komplementation einer Cadmiumhypersensitiven Mutante das Gen *hmt2* identifiziert, das für ein Protein mit SQR-Aktivität kodiert (Vande Weghe und Ow, 1999). Bei dem Protein, das in den Mitochondrien lokalisiert ist, handelt es sich um ein lösliches Flavoprotein, das *in vitro* die sulfidabhängige Reduktion von Chinon katalysiert. Allerdings wurden für beide Substrate K_M-Werte von 2 mM gemessen, die ca. um den Faktor 1000 höher als die für SQRs bestimmten Werte liegen (Griesbeck et al., 2000). Da Hefe bei solch hohen Sulfid-Konzentrationen nicht überlebensfähig ist, scheint es sich bei HMT2 nicht um eine SQR zu handeln, vielmehr scheint dieses Protein bei hohen Konzentrationen von Sulfid und Chinon artifiziell die SQR-Reaktion zu katalysieren.

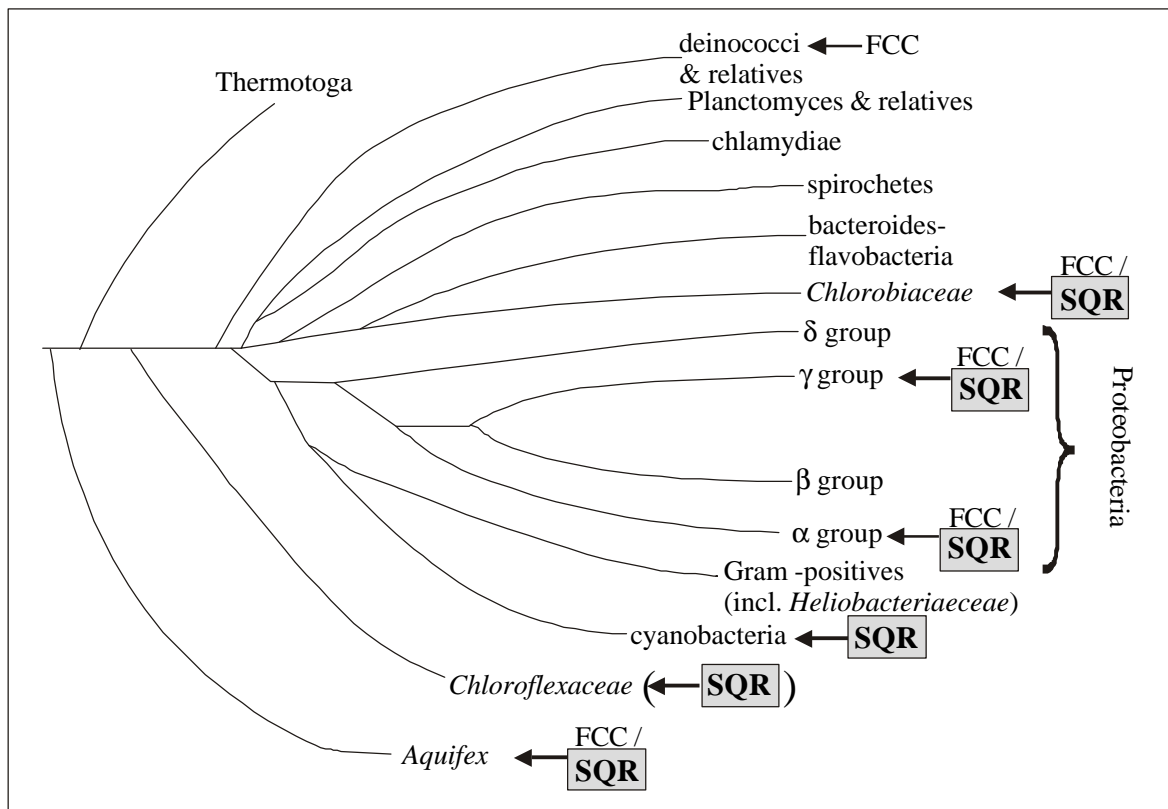


Abb. 4.4. Verbreitung der SQR innerhalb der Bakterien. Stammbaum der Bakterien auf Basis der 16S rRNA (nach Brune, 1995) und Vorkommen von SQR (SQR-Aktivität und/oder Gensequenz) und FCC. Bei den Messungen zur SQR-Aktivität bei *Chloroflexaceae* handelt es sich um vorläufige Ergebnisse (M. Schütz, persönliche Mitteilung).

4.3. Flavoproteine der Disulfid-Oxidoreduktase-Familie

Flavine stellen äußerst vielseitige Coenzyme dar, die in einer Vielzahl von enzymatischen Reaktionen zum Einsatz kommen. Abhängig von der Umgebung, die das jeweilige Protein zur Verfügung stellt, können sie 1- oder 2-Elektronenübergänge katalysieren, mit einer großen Zahl von Substraten wechselwirken und einen Redoxbereich von über 600 mV abdecken (Ghisla und Massey, 1989; Massey, 2000). Basierend auf funktionellen Unterschieden lassen sich Flavoproteine in fünf Klassen einteilen, von denen die Klasse der Transhydrogenasen 2 e⁻ - Übergänge zwischen verschiedenen Redoxzentren katalysiert. Anhand der Substrate läßt sich hier die Unterklasse der C-S-Transhydrogenasen unterscheiden, deren Mitglieder Redoxreaktionen zwischen Kohlenstoff- und Schwefelatomen katalysieren, im allgemeinen zwischen einem Nicotinamid-Nukleotid und einem Disulfid/Dithiol (Massey und Hemmerich, 1980). Diese Familie der Disulfid-Oxidoreduktasen wird auch nach einem prominenten und gut untersuchten Vertreter Glutathion Reduktase-Familie genannt.

Merkmale dieser Enzyme sind die homodimere Organisation mit einem FAD pro Untereinheit, eine redoxaktive Disulfidbrücke und die Reaktion mit einem Nicotinamid-Nucleotid als Substrat. Charakteristischerweise bildet eines der beteiligten Cysteine während des Reaktionszyklus ein Thioladdukt mit dem Kohlenstoffatom 4a des FAD und als Thiolat ein Charge Transfer-Addukt mit dem oxidierten FAD. Stabilisierung des Thiolats erfolgt durch Basenkatalyse (Williams Jr., 1992).

Gut charakterisierte Vertreter dieser Familie sind Glutathion Reduktase, Lipoamid-Dehydrogenase, Thioredoxin Reduktase und Mercuri Reduktase. Obwohl die Sequenzidentität zwischen diesen Proteinen nur zwischen ca. 21 und 34 % liegt, bilden sie auch strukturell eine Gruppe innerhalb der Flavoproteine mit einem Aufbau aus vier Domänen (Mathews, 1991; Williams Jr., 1992). Während die Domänen 1 und 2 für die Bindung von FAD bzw. des Nicotinamid-Nukleotids zuständig sind, wird die dritte Domäne als zentrale Domäne bezeichnet. Die letzte Domäne bildet als „Interface-Domäne“ einen Teil des katalytischen Zentrums der jeweils anderen Untereinheit im Homodimer. Auch das mechanistisch untersuchte und strukturell aufgeklärte FCC gehört mit einer redoxaktiven Disulfidbrücke und dem Domänenaufbau zu dieser Familie (Van Driessche et al., 1996).

Der Vergleich der SQR-Aminosäuresequenz mit den Sequenzen von Vertretern der Glutathion Reduktase-Familie zeigte, daß auch die SQR zu dieser Familie gehört. Zwar liegt auch hier die Sequenzidentität bzgl. der gesamten Länge nur geringfügig über 20 %, aber innerhalb der drei FAD-bindenden Bereiche zeigt sich deutliche Übereinstimmung mit den Disulfid-Oxidoreduktasen. Darüberhinaus legt die Konservierung von drei Cysteinresten, von denen zwei an identischen Stellen wie in FCC liegen (s. **Abb. 4.3.**, S. 17f), auch für die SQR eine redoxaktive Disulfidbrücke in Nachbarschaft zum FAD nahe, und eine homodimere Organisation wird auch bei der SQR angenommen (s. Abschnitt 4.2.2.1., S. 15).

4.4. Ziel der Arbeit

Zur Untersuchung des bisher unbekanntes Mechanismus der SQR-Reaktion war es nötig, größere Mengen gereinigtes Protein durch ein heterologes Expressions- und Reinigungssystem zu gewinnen. Damit sollte es ermöglicht werden, die SQR biochemisch und physikochemisch zu charakterisieren und die Eigenschaften von spezifisch mutierten SQR-Proteinen zu untersuchen. Da die Reinigung von nicht-modifizierter, heterolog exprimierter SQR aus *E. coli* aufgrund der aufwendigen Reinigungsmethode und der zu geringen Ausbeute nicht zum gewünschten Ergebnis geführt hatte (Schütz, 1997), war bereits eine C-terminale Modifikation aus 10 Histidinen an die SQR angebracht worden, um das Protein durch Nickel-Affinitätschromatographie reinigen zu können. Das so modifizierte Protein zeigte aber keine spezifische Wechselwirkung mit der Affinitätssäule (Schütz, 1997; Griesbeck, 1998). Aus diesem Grund sollte ein neuer Ansatz zur effizienten Expression und Reinigung gefunden werden.

Auf Basis eines heterologen Expressions- und Reinigungssystems sollten durch sequenzspezifische Mutagenese funktionell bedeutsame Aminosäuren identifiziert und Daten über den Mechanismus der SQR-Reaktion erhalten werden. Zur Identifizierung konservierter Aminosäuren konnte ein Alignment der bisher bekannten SQR-Sequenzen herangezogen werden, außerdem ein Vergleich der SQR mit FCC und anderen Vertretern der Disulfid-Oxidoreduktase-Familie. Schließlich sollte versucht werden, Daten über das *in vitro* bisher nicht identifizierte Schwefelprodukt der SQR-Reaktion zu gewinnen, um daraus Rückschlüsse auf einen Reaktionsmechanismus ziehen zu können.

5. Ergebnisse

5.1. Heterologe Expression und Reinigung der SQR aus *Rb. capsulatus*

Für eine eingehende biochemische und physikochemische Charakterisierung der SQR müssen größere Mengen Protein zur Verfügung stehen als aus *Rb. capsulatus* isoliert werden können. Schütz et al. (1997) zeigten bereits die Möglichkeit der heterologen Expression des *sqr*-Gens in *E. coli*. Dabei konnte funktionelles Enzym erhalten werden, in das die prosthetische Gruppe FAD inkorporiert war. Aufgrund der aufwendigen Reinigungsprozedur war die Ausbeute allerdings sehr gering, und das Enzym war teilweise inaktiviert. Die Reinigung mit Hilfe eines C-terminal angefügten Tags aus 10 Histidinen wurde von Schütz (1997) und Griesbeck (1998) eingehend untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß der His-Tag offensichtlich nicht genügend exponiert war, um eine Wechselwirkung mit der Ni-NTA-Säule zu gewährleisten.

Deshalb wurde für diese Arbeit ein Ansatz mit einem N-terminalen His-Tag gewählt. Hierbei wurden durch PCR an das 5'-Ende des *sqr*-Gens die Codons für 6 Histidine und daran anschließend eine Erkennungssequenz für die Protease Enterokinase angefügt (s. 8.2.3.1., S. 90). Die Enterokinasespaltsequenz besteht aus 4 Aspartaten und einem Lysin. Dieses Konstrukt wurde analog zu dem von Schütz et al. (1997) verwendeten pTSQR-Konstrukt in den Expressionsvektor pT7-7 eingesetzt und pTHSQR genannt (s. **Abb. 5.1.**). Zur Kontrolle wurde hierbei das komplette *sqr*-Gen sequenziert.

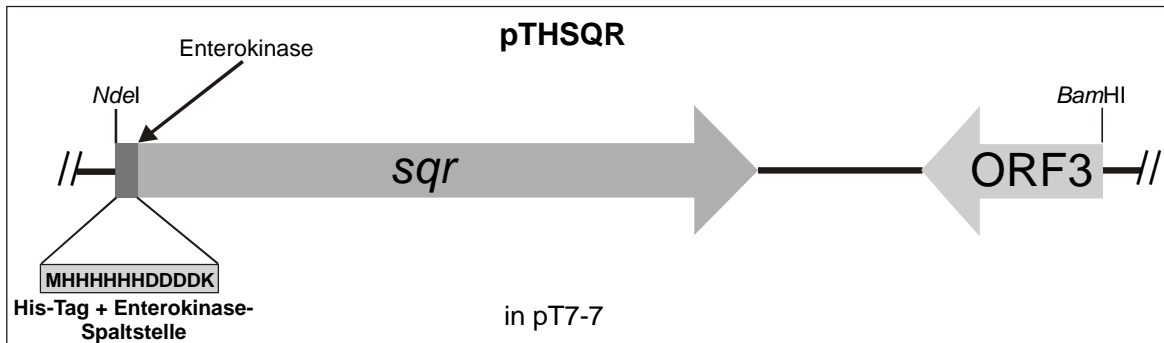


Abb. 5.1. Expressionskonstrukt pTHSQR. Bei dem Insert im Vektor pT7-7 handelt es sich um das *NdeI*-*BamHI*-Fragment aus pUSQR, wobei durch PCR am 5'-Ende des *sqr*-Gens His-Tag und Enterokinase-Spaltstelle eingefügt wurden. Die Enterokinase spaltet die Peptidbindung nach der Erkennungssequenz DDDDK. Vor dem *sqr*-Gen befindet sich der Promotor für die T7-RNA-Polymerase.

Dieses Konstrukt wurde für die Expression in *E. coli* BL21(DE3) eingebracht. Nach Induktion war in der SDS-PAGE eine prominente Bande bei ca. 55 kDa zu sehen (s. **Abb. 5.2.**, S. 23). Zellaufschluß und Isolierung der Membranen von *E. coli* zeigten jedoch, daß der größte Teil der SQR in Inclusion Bodies vorlag. Um den Anteil der SQR in der Membranfraktion zu erhöhen, wurde die Temperatur nach Induktion auf 25°C verringert. Die Solubilisierung der Membranproteine wurde mit 0,6 % Thesit oder mit 0,6 % Dodecylmaltosid vorgenommen. Alternativ wurde auch mit 2 M NaBr solubilisiert. Da hierbei nur peripher gebundene Membranproteine solubilisiert werden und die SQR auf diese Weise von der Membran abgelöst werden konnte, zeigte sich, daß die SQR auch

heterolog in *E. coli* exprimiert peripher membrangebunden vorliegt, wie es schon bei der Isolierung aus *Rb. capsulatus* gezeigt worden war (Schütz, 1997). Im Anschluß an die Solubilisierung konnte die SQR in einem Schritt mit Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Hierbei wurde Bindung des Proteins an die Säulenmatrix bis ca. 150 mM Imidazol beobachtet, darüber konnte saubere SQR eluiert werden, was durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung überprüft wurde. Aus den vereinigten sauberen Fraktionen wurde durch Dialyse Imidazol entfernt. Schließlich konnten durch Proteinkonzentratoren SQR-Lösungen mit bis zu 9 mg/ml Protein erhalten werden. Die Ausbeute betrug im Durchschnitt ca. 3 - 5 mg Protein aus 1 l *E. coli*-Kultur.

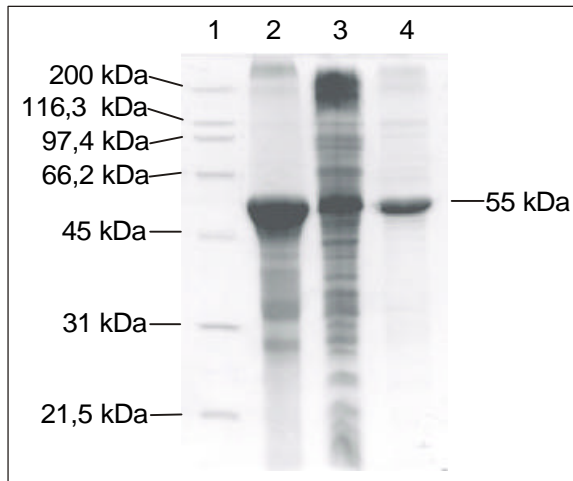


Abb. 5.2. SDS-PAGE: Reinigung der His-Tag-SQR. 1 SDS-PAGE-Standard; 2 *E. coli*-Zellen nach Induktion; 3 isolierte *E. coli*-Membranen; 4 gereinigte SQR.

Abspaltung des His-Tags durch Enterokinase wurde in Lösung und gebunden an eine Ni-NTA-Säule versucht. In keinem Fall konnte der His-Tag abgespalten werden. Da die Ergebnisse der in 5.2. beschriebenen Charakterisierung des Proteins in Einklang mit den von Schütz (1997) berichteten Ergebnissen waren, wurde auf eine Abspaltung verzichtet.

5.2. Charakterisierung der heterolog exprimierten SQR

5.2.1. Spezifische Aktivität

5.2.1.1. Bestimmung des Differenz-Extinktionskoeffizienten von dUQ in wässriger Lösung und Optimierung der Versuchsbedingungen

Zur Bestimmung der SQR-Aktivität wurde vorgegangen wie bei Shahak et al. (1994) beschrieben. Allerdings wurde dort ein Differenz-Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280-300}$ von $15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet, der zwar als ϵ_{275} für UQ in Ethanol beschrieben ist (Morton, 1965), aber als Differenz-Extinktionskoeffizient $\epsilon_{275-300}$ für den Übergang von dUQ zu dUQH₂ nicht exakt verwendbar war. Deshalb wurden bei der Sulfid-abhängigen Reduktion von bekannten Mengen dUQ durch SQR Absorptionsspektren aufgenommen und ausgewertet (s. **Abb. 5.3.**). Dabei wurde ein Differenz-Extinktionskoeffizient $\epsilon_{275-300}$ für den Übergang von dUQ zu dUQH₂ von $12,5 \text{ mM}^{-1}$ gemessen.

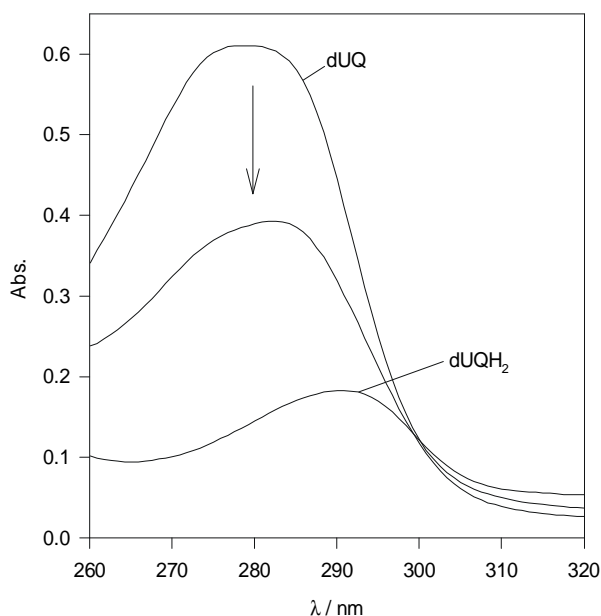


Abb. 5.3. Sulfid-abhängige Reduktion von 40 μM dUQ durch SQR. Spektren wurden vor, während und am Ende der Reaktion aufgenommen. Der Pfeil zeigt die Abnahme der Absorption bei 275 nm.

Weiterhin wurde beobachtet, daß die Absorption von dUQ in wässriger Lösung nur bis zu einer Konzentration von maximal 40 μM proportional zur Konzentration war. Über 40 μM nahm die Absorption nur noch in geringem Maß zu. Deshalb konnten in Aktivitätstests nur Konzentrationen von maximal 40 μM eingesetzt werden. Darüberhinaus wurde der Einfluß des Detergenz Thesit auf wässrige dUQ-Lösungen untersucht. Während die $\text{OD}_{275-300}$ von dUQ in wässriger Lösung ohne Detergenz innerhalb von 5 min, der Mindestdauer für einen Aktivitätstest, um bis zu 15 % abnahm und sich das Absorptionsmaximum von 275 auf 280 nm verschob, zeigte sich ein stabilisierender Einfluß von Thesit in Konzentrationen im Bereich des Fünffachen der kritischen Mizellarkonzentration ($5 \times \text{cmc}$; 0,025 %), d.h. in Gegenwart von Thesit traten die beobachteten spektralen Veränderungen nicht auf. Wenn die Thesit-Konzentration weiter auf $10 \times \text{cmc}$ (0,05 %) erhöht wurde, nahm die SQR-Aktivität auf ca. 35 % der Aktivität ohne Thesit oder bei 0,025 % Thesit ab. Als optimale Bedingungen für den SQR-Aktivitätstest wurden deshalb 40 μM dUQ und 0,025 % ($5 \times \text{cmc}$) Thesit ermittelt.

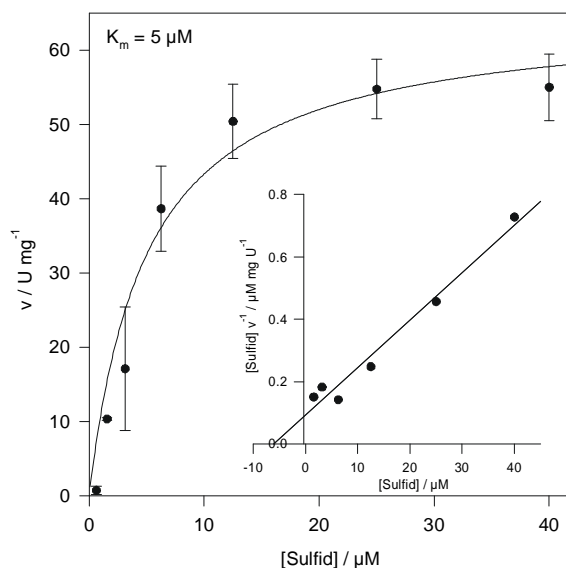
5.2.1.2. Spezifische Aktivität der SQR

Für die aus *Rb. capsulatus* gereinigte SQR wurde eine spezifische Aktivität von 7,7 U/mg (nach Korrektur gemäß Abschnitt 6.2.1., S. 58f) bestimmt (Schütz, 1997). Nach heterologer Expression des nicht-modifizierten *sqr*-Gens in *E. coli* und Reinigung in analoger Weise wie aus *Rb. capsulatus* wies gereinigtes Enzym eine spezifische Aktivität von von 22 - 33 U/mg (nach Korrektur gemäß Abschnitt 6.2.1., S. 58f) (ebd.) auf. Eine weitere Erhöhung erbrachte der vorliegende Ansatz, der nach Reinigung des N-terminal modifizierten Proteins aus *E. coli* mit Ni-NTA-Affinitätschromatographie eine spezifische Aktivität von 50 - 55 U/mg bei frisch gereinigten Proben zeigte. Hierbei war es nicht entscheidend, ob das Protein mit Thesit, Dodecylmaltosid oder NaBr solubilisiert worden war und ob sich nach Reinigung Detergenz im Puffer befand oder nicht. Ein negativer Einfluß des His-Tags auf die Umsatzrate des Proteins konnte damit ausgeschlossen werden.

5.2.2. Substrataffinität

Im Falle der C-terminal durch Histidine modifizierten SQR hatte Schütz (1997) eine minimale Erhöhung der K_M -Werte für Sulfid (von 2 μM auf 4 μM) und Chinon (von 2 μM auf 3 μM) gemessen. Eine entsprechende minimale K_M -Erhöhung wurde für die N-terminal modifizierte SQR beobachtet. Hierbei wurde für Sulfid ein K_M von 5 μM und für Chinon ein K_M von 3 μM (s. **Abb. 5.4.**) bestimmt. Damit wurde gezeigt, daß die N-terminale Modifikation praktisch keine Veränderung der Bindungseigenschaften des Enzyms für seine Substrate nach sich zieht.

A K_M für Sulfid



B K_M für dUQ

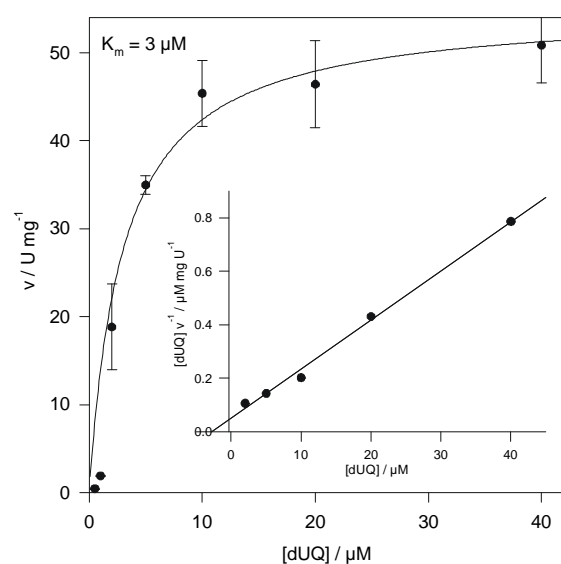


Abb. 5.4. Substrataffinität der N-terminal modifizierten SQR. Gezeigt ist jeweils die Auftragung und Auswertung nach Michaelis und Menten und die linearisierte Auftragung nach Hanes (1932) (Einschub). **A** K_M für Sulfid. **B** K_M für dUQ. Für jeden Meßpunkt wurde ein Mittelwert aus mindestens 3 Messungen errechnet.

5.2.3. FAD-Gehalt

Die prosthetische Gruppe FAD kann kovalent an das Protein gebunden sein oder nicht-kovalent. Innerhalb der Glutathion Reduktase-Familie der Flavoproteine sind beide Möglichkeiten verwirklicht. Während in FCC das FAD kovalent an einen Cystein-Rest gebunden vorliegt (Chen et al., 1994), ist das Flavin in der Glutathion Reduktase nicht-kovalent gebunden (Staal et al., 1969; Karplus und Schulz, 1987). Aus der SQR konnte FAD sowohl mit H_2SO_4 (Engels et al., 1997) als auch mit KBr (Husain und Massey, 1979) extrahiert und anschließend durch Rekonstitution mit dem D-Aminosäure-Oxidase-Apoprotein sowohl qualitativ als FAD als auch quantitativ bestimmt werden (s. 8.3.6., S. 96f). Diese Ergebnisse konnten auch durch quantitative fluorimetrische Flavin-Bestimmung bestätigt werden. Damit wurde gezeigt, daß das FAD in der SQR nicht-kovalent gebunden vorliegt. Ein Hinweis auf nicht-kovalente Bindung war bereits in Versuchen erbracht worden, bei denen während der Rückfaltung von denaturierter SQR nur in Gegenwart von extern zugegebenem FAD im Rückfaltungsansatz aktives Enzym erhalten worden war (Griesbeck, 1998).

Die quantitative Bestimmung ergab für verschiedene SQR-Präparationen substöchiometrische FAD-Mengen. Der Gehalt lag bei allen Präparationen zwischen 5 und 25 % bezogen auf das SQR-Monomer. Um den FAD-Gehalt des gereinigten Enzyms zu erhöhen, wurden in Zusammenarbeit mit Thomas Schödl verschiedene Modifikationen der Expressions- und Reinigungsbedingungen überprüft. Da bei Reinigung von cyanobakteriellem Phytochrom auf einer Ni-NTA-Säule das Chromophor Phytochromobilin teilweise verloren geht und deshalb in die entsprechenden Puffer zugesetzt wird (Mozley et al., 1997; W. Gärtner, persönliche Mitteilung), wurde in Analogie bei einigen Versuchen FAD in die Puffer der Ni-NTA-Affinitätschromatographie zugegeben, um Inkorporation von freiem FAD in an die Ni-NTA-Matrix fixiertes SQR-Protein zu ermöglichen. Dieser Ansatz erbrachte eine Erhöhung des FAD-Gehalts auf bis zu 50 %. Da der geringe FAD-Gehalt in SQR-Präparationen möglicherweise auch auf die mangelnde Fähigkeit von *E. coli* zurückzuführen war, ausreichende Mengen von FAD für die SQR-Expression zu produzieren, FMN aber besser von *E. coli* aufgenommen werden kann als FAD (N. Nelson, persönliche Mitteilung), wurde FMN ins Wachstumsmedium zugegeben. Hier wurde jedoch keine Erhöhung des FAD-Gehalts festgestellt.

5.2.4. Fluoreszenzspektroskopie

Während manche Flavoproteine wie die D-Aminosäure-Oxidase bevorzugt im reduzierten Zustand fluoreszieren, zeigen andere wie das Old Yellow Enzyme Fluoreszenz in der oxidierten Form (Munro und Noble, 1999). Die aus *Rb. capsulatus* isolierte SQR zeigt im oxidierten Zustand Fluoreszenz mit Anregungsmaxima bei 280, 375 und 470 nm bei einer maximalen Emission bei 520 nm. Reduktion durch Sulfid führt konzentrationsabhängig zu einer Unterdrückung der Anregungsmaxima, während bei Reoxidation durch Chinon die Fluoreszenz beinahe vollständig wiederhergestellt wird (Schütz et al., 1997). Das Fluoreszenzverhalten der aus *E. coli* isolierten SQR erwies sich als beinahe identisch mit dem der nativen SQR. Während allerdings bei der nativen SQR das Verhältnis der Maxima 280 nm : 375 nm : 470 nm 3 : 1 : 1,2 beträgt, fand sich für die His-Tag-SQR ein Verhältnis von 1 : 1,25 : 1,75, d.h. das Maximum bei 280 nm erwies sich als niedriger (s. **Abb. 5.5.**).

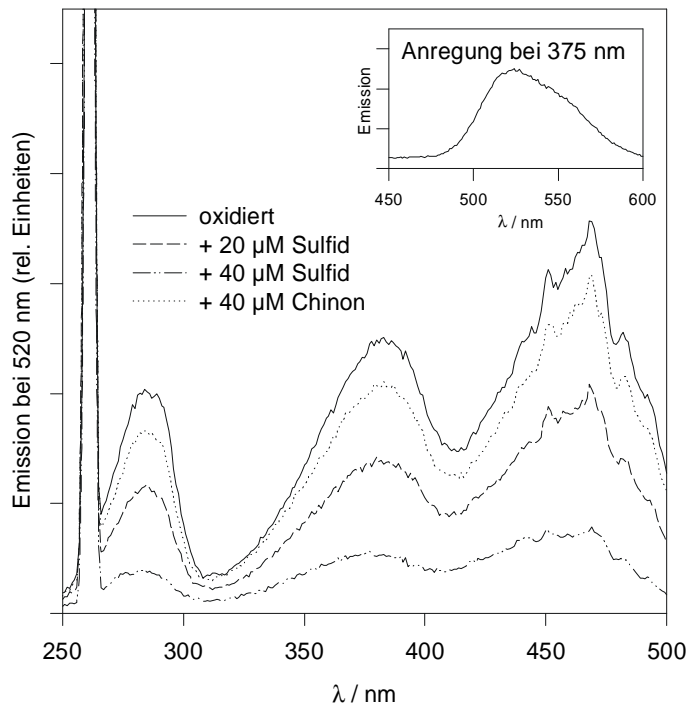


Abb. 5.5. Fluoreszenzspektrum der gereinigten SQR. Anregungsspektrum der gereinigten His-Tag-SQR in 50 mM BisTris, pH 6,5 in der oxidierten Form (durchgezogene Linie), nach Reduktion mit 20 μM (gestrichelt) und 40 μM Sulfid (Striche und Punkte) und nach anschließender Reoxidation mit 40 μM UQ (gepunktete Linie). Einschub: Emissionsspektrum bei Anregung mit 375 nm. Proteinkonzentration: 0,2 mg/ml. Die Spektren des Puffers wurden jeweils abgezogen.

5.2.5. Isoelektrischer Punkt

Der isoelektrische Punkt (IEP) der His-Tag-SQR wurde durch isoelektrische Fokussierung mit Hilfe einer Chromatofokussing-Säule (s. 8.3.10., S. 99) bestimmt. Bei dieser Ionentauschersäule wird mit einem pH-Gradienten eluiert. Sobald der pH-Wert den isoelektrischen Punkt des auf der Säule gebundenen Proteins erreicht, eluiert das Protein. Laut Herstellerangaben liegt der isoelektrische Punkt eines Proteins ca. 0,1 pH-Einheiten höher als der pH des Elutionsmaximums. Mit einem pH-Gradienten von 7,4 bis 5,0 eluierte die SQR im Bereich zwischen 6,35 und 6,0. Bei einem Elutionsmaximum bei 6,1 konnte der isoelektrische Punkt somit auf 6,2 bestimmt werden (s. **Abb. 5.6.**, S. 28).

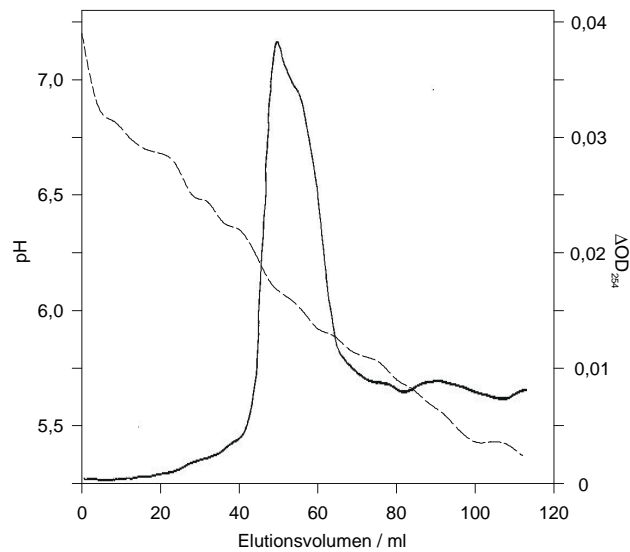


Abb. 5.6. Chromatogramm der Chromatofokussing-Säule. Durchgezogene Linie: Chromatogramm, gestrichelte Linie: pH.

Theoretisch wurde für die am N-Terminus mit 6 Histidinen, 4 Aspartaten und 1 Lysin modifizierte SQR ein IEP von 6,9 ermittelt, der um 0,8 pH-Einheiten niedriger liegt als der für das native Protein theoretisch ermittelte Wert von 7,7. Die Nettoladung bei dem von Schütz et al. (1999) ermittelten pH-Optimum der SQR-Aktivität von 6,3 liegt theoretisch bei +2,5 für das modifizierte Protein und +4,0 für das native.

5.2.6. pH-Abhängigkeit der SQR-Reaktion

Durch die Einführung des His-Tags und der Enterokinase-Spaltsequenz wurden mit 6 Histidinen, 4 Aspartaten und einem Lysin 11 geladene Aminosäuren an die SQR angefügt. Um einen Einfluß dieser Ladungen auf die Aktivität festzustellen, wurde die Abhängigkeit der SQR vom pH-Wert gemessen. Für die native SQR war ein pH-Optimum von 6,3 gemessen worden (Schütz, 1997). Um bei der Messung einen Einfluß der verschiedenen pH-Puffer und Salzgehalte zu vermeiden, wurde hierbei eine Mischung aus 6 pH-Puffern verwendet, die mit HCl bzw. NaOH zu dem jeweiligen gewünschten pH titriert wurde (s. 8.3.7., S. 97f). Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Nicola Mederer durchgeführt. **Abb. 5.7.** (S. 29) zeigt einen breiten Aktivitätsbereich mit 50 %-Grenzen bei pH 4,5 und 8. Das Optimum lag bei pH 6,7. Auffällig ist ein lokales Minimum bei pH 5,5 neben einem zweiten geringeren Optimum bei pH 5,0. Im Vergleich dazu lag das pH-Optimum der SQR mit einer C-terminalen Modifikation aus 10 Histidinen ebenfalls im Bereich von pH 6,5 bis 6,7, dieses Enzym zeigte aber einen deutlich schmaleren Aktivitätsbereich sowohl im Basischen als auch im Sauren (Griesbeck, 1998).

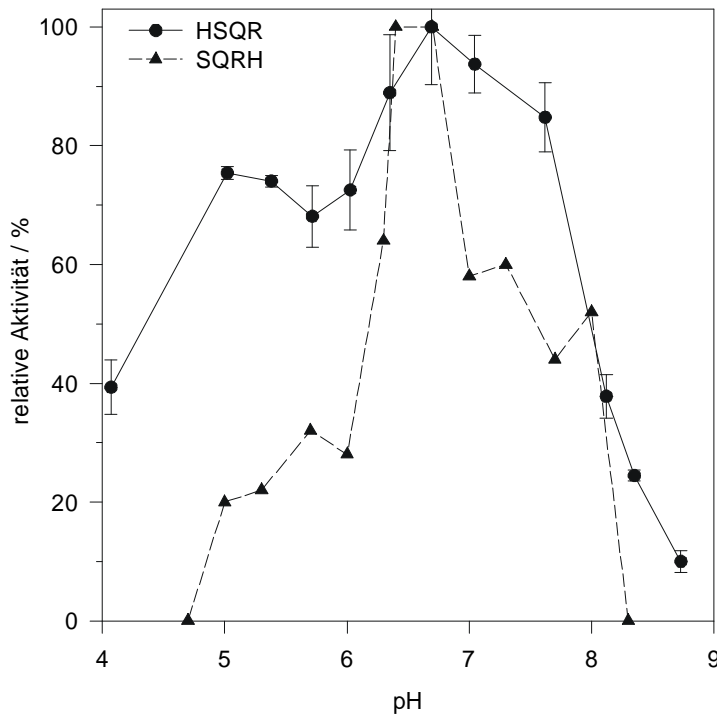


Abb. 5.7. pH-Abhängigkeit der SQR-Reaktion. Es wurde die relative Aktivität bezogen auf die maximale Aktivität am pH-Optimum aufgetragen. Die Messung wurde bei 30°C durchgeführt. HSQR: N-terminal modifizierte SQR, Messung am gereinigten Enzym; SQRH: SQR mit 10 Histidinen am C-Terminus, Messung von Membranen aus *E. coli* (Griesbeck, 1998). Für jeden Meßpunkt wurde ein Mittelwert aus mindestens 3 Messungen errechnet.

5.2.7. CD-Spektroskopie

Anhand des CD-Spektrums im Fern-UV-Bereich lassen sich Aussagen über die Sekundärstruktur eines Proteins treffen. Hierbei können durch Datenbank-gestützte Auswertung die Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturtypen berechnet werden. Ziel der Messungen war es zu überprüfen, ob die für die SQR auf Basis der CD-Messungen errechneten Anteile der Sekundärstrukturen ähnlich zu der aufgeklärten Kristallstruktur der Glutathion Reduktase (GR) sind und somit eine insgesamt ähnliche Struktur zu erwarten ist. Zum anderen war gezeigt worden, daß die Reinigung der SQR mit Detergenz (Thesit oder Dodecylmaltosid) und NaBr (ohne Detergenz) Enzym mit gleicher spezifischer Aktivität (s. 5.2.1.2., S. 25), aber verschiedener Stabilität (s. 6.1., S. 57f) ergab. Deshalb sollte überprüft werden, ob die Anwesenheit von Detergenz einen sichtbaren Einfluß auf die Gesamtsekundärstruktur hat.

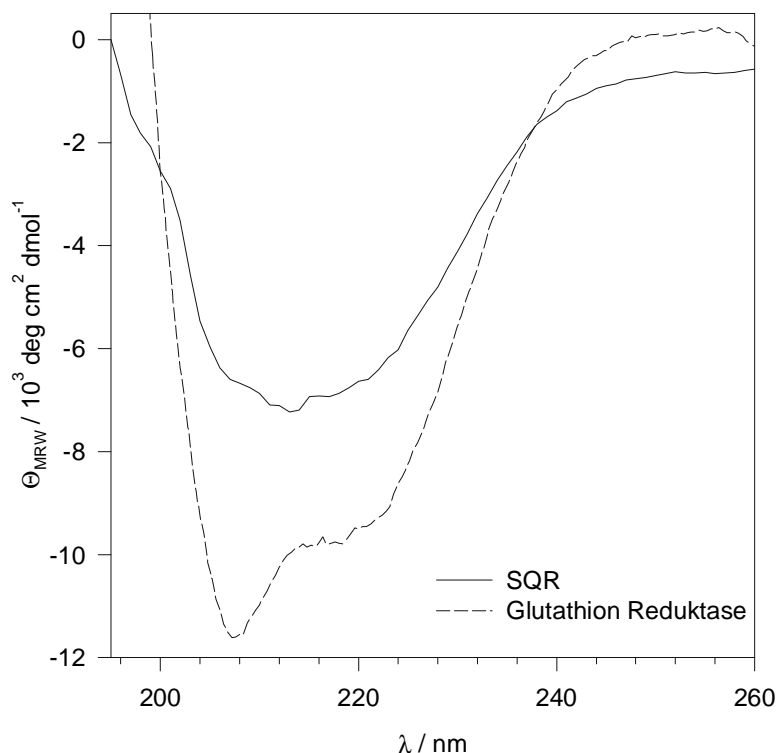


Abb. 5.8. CD-Spektrum der SQR im Vergleich zur Glutathion Reduktase (GR). Spektrum der GR: Pancoska et al. (1995).

Abb. 5.8. zeigt das Fern-UV-CD-Spektrum der SQR. Im Bereich von ca. 230 - 192 nm zeigte die SQR einen breiten negativen Peak mit einem Minimum bei ca. 212 nm. Hierbei erwiesen sich die Spektren in Gegenwart und Abwesenheit von Thesit als identisch, so daß ein Einfluß von Detergenz auf die Gesamtsekundärstruktur ausgeschlossen werden kann. Gegenüber dem SQR-Spektrum weist das Spektrum der GR innerhalb eines breiten negativen Peaks, der im gleichen Bereich wie der der SQR liegt, ein ausgeprägtes Minimum bei 208 nm auf. Mit der Datenbank-Software CDNN (s. 8.4.2., S. 102) wurden aus dem CD-Spektrum der SQR anhand von 13 CD-Spektren strukturell bekannter Proteine die Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturtypen berechnet. Die gleiche Berechnung wurde für die GR durchgeführt, wobei eine weitgehende Übereinstimmung mit den Daten aus der Kristallstruktur der GR (Karplus und Schulz, 1987; Van Driessche et al., 1996) festgestellt wurde. In **Tab. 5.1.** sind die Sekundärstrukturanteile für SQR und GR dargestellt. Während der Anteil von β -turn mit 19 % und von antiparallelem β -Faltblatt mit 14 % für beide Proteine als identisch berechnet wurden, zeigten sich kleinere Abweichungen bei parallelem β -Faltblatt mit 12 % (SQR) bzw. 9 % (GR) und bei der α -Helix mit 22 % (SQR) bzw. 29 % (GR). Somit ergaben sich aus den CD-Spektren beider Proteine insgesamt ähnliche Sekundärstrukturanteile, wobei der helikale Anteil der SQR etwas geringer war.

Tab. 5.1. Sekundärstrukturanteile von SQR und GR. Die Daten wurden anhand der CD-Spektren mit der Software CDNN ermittelt.

Protein	α -Helix	b-Faltblatt antiparallel	b-Faltblatt parallel	b-turn	random coil
SQR	22 %	14 %	12 %	19 %	33 %
GR	29 %	14 %	9 %	19 %	29 %

5.2.8. Temperaturabhängigkeit und Stabilität

5.2.8.1. Temperaturabhängigkeit der SQR-Aktivität

Bei *Rb. capsulatus* handelt sich um einen mesophilen Organismus mit einem Temperaturoptimum von 33°C (Hansen und Van Gernerden, 1972), was eine Optimierung der Enzyme auf diese Temperatur erwarten läßt. Demgegenüber wurde SQR-Aktivität auch in Membranen des hyperthermophilen Bakteriums *Aquifex aeolicus* (*A. aeolicus*) gemessen (Nübel et al., 2000). Dieses Enzym zeigt ein Temperaturoptimum von über 70°C. Aus der Aminosäuresequenz dieses Enzyms, die zu 38 % identisch zur SQR aus *Rb. capsulatus* ist, lassen sich nur wenige Unterschiede im Vergleich zu den mesophilen Enzymen feststellen, die für eine größere Stabilisierung, z.B. durch verstärkte ionische Wechselwirkung, verantwortlich gemacht werden können (s. Abschnitt 4.2.2.2., S. 15ff). Um einen Vergleich beider Enzyme anstellen zu können, wurde die Abhängigkeit der Aktivität der *Rb. capsulatus*-SQR von der Temperatur und die Stabilität bei erhöhter Temperatur gemessen.

Die Messungen zur Abhängigkeit der SQR-Aktivität von der Temperatur und zur Stabilität der SQR wurden in Zusammenarbeit mit Nicola Mederer durchgeführt. **Abb. 5.9.** zeigt die Abhängigkeit der SQR-Reaktion von der Temperatur. Dabei wurde ein kontinuierlicher Anstieg bis 45°C beobachtet, bei weiterer Erhöhung der Temperatur um 5°C sank die Aktivität auf die Hälfte ab. Bei 68°C war nur noch chemische Umsetzung von Sulfid und dUQ zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigte die SQR-Aktivität in Membranen von *A. aeolicus* bis zur höchsten gemessenen Temperatur von 70°C immer noch einen steilen Anstieg (Nübel et al., 2000).

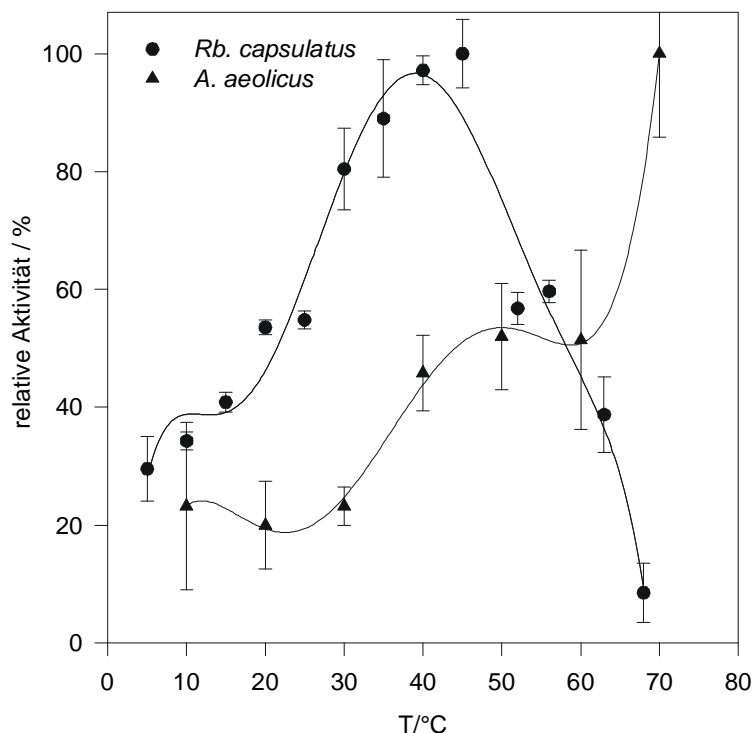
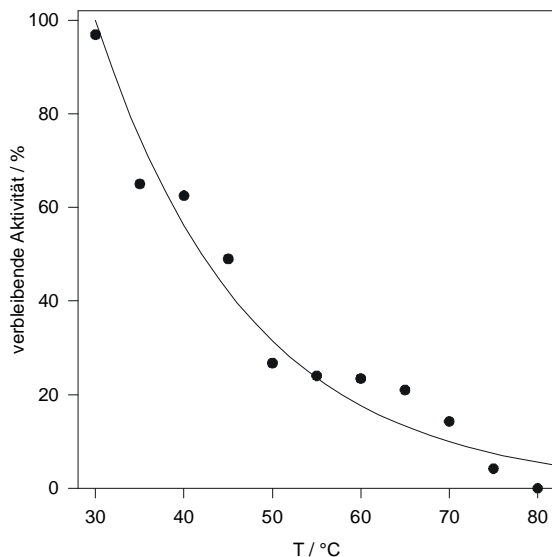


Abb. 5.9. Temperaturabhängigkeit der SQR-Reaktion. Gezeigt sind die Messungen für das isolierte Enzym aus *Rb. capsulatus* und die SQR-Aktivität in Membranen von *Aquifex aeolicus* (Nübel et al., 2000). Die chemische Hintergrundreaktion war ab 45°C meßbar. Sie wurde für jeden Meßpunkt bestimmt und abgezogen. Für jeden Meßpunkt wurde ein Mittelwert aus mindestens 3 Messungen errechnet.

5.2.8.2. Temperaturabhängigkeit der SQR-Stabilität

Die Stabilität der SQR-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur wurde bestimmt, indem das Enzym 1 h bei verschiedenen Temperaturen inkubiert wurde. Anschließend wurde die Aktivität bei 30°C gemessen (s. **Abb. 5.10.A**). Allein bei 30°C war kein Verlust der Aktivität innerhalb von 1 h festzustellen, bereits bei 35°C war ein Verlust von über 40 % zu verzeichnen. Bei Temperaturen bis 60°C war eine Restaktivität von über 20 % zu beobachten, durch Temperaturen von über 70°C wurde das Enzym komplett denaturiert. Ein ähnliches Bild ergab sich aus der Messung der Sekundärstrukturintegrität durch CD in Abhängigkeit von der Temperatur. Hierbei wurde der Verlust der Elliptizität bei 221 nm mit steigender Temperatur gemessen (s. **Abb. 5.10.B**). Hier war nur ein geringer Verlust an Sekundärstruktur bis 60°C zu beobachten, darüber nimmt die Elliptizität deutlich ab bis auf ca. $0 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$. Eine Rückfaltung nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte nicht, das CD-Spektrum wies keinerlei Elliptizität mehr auf (nicht gezeigt).

A Aktivität nach einstündiger Inkubation



B Elliptizität bei 221 nm

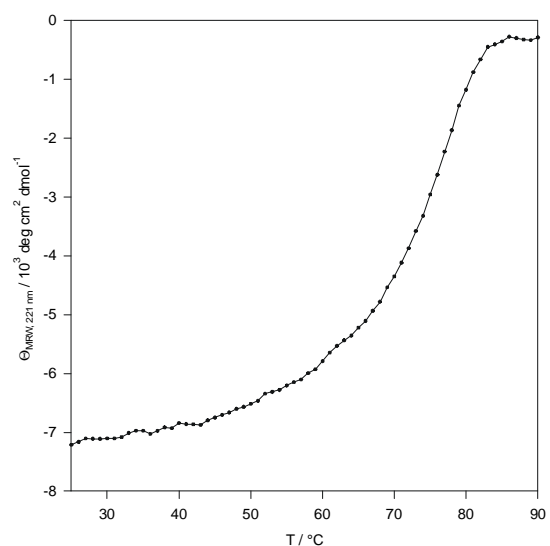


Abb. 5.10. Temperaturabhängigkeit der Stabilität der SQR aus *Rb. capsulatus*. **A** Relative SQR-Aktivität nach einstündiger Inkubation bei der jeweiligen angegebenen Temperatur. Die Aktivitätsmessung erfolgte jeweils bei 30°C. **B** Elliptizität bei 221 nm. Der Temperaturübergang erfolgte von 25 - 90°C in 1°C-Schritten. Bei jeder Stufe wurde die Temperatur für 40 s konstant gehalten.

5.2.8.3. Lichtabhängigkeit der SQR-Stabilität

Bei der Aufbewahrung von SQR-Präparationen wurde eine rasche Abnahme der Aktivität bei Belichtung beobachtet, während im Dunkeln aufbewahrte Proben einen geringeren Aktivitätsverlust aufwiesen. Deshalb wurde der Einfluß von Licht auf die Stabilität der SQR systematisch untersucht.

Abb. 5.11. (S. 33) zeigt die SQR-Aktivität von Proben, die bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln bzw. unter konstanter Beleuchtung mit einer 60 W-Glühbirne aufbewahrt wurden, im Zeitraum über mehrere Tage. Die Ergebnisse bei Aufbewahrung auf Eis waren identisch mit den bei RT gemessenen und werden deshalb nicht gezeigt. Während die im Licht gelagerte SQR nach einem

Tag bereits einen Aktivitätsverlust von 50 % und nach 5 Tagen fast keinerlei Aktivität mehr zeigte, was einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 1,7 d entsprach, war der Verlust der im Dunkeln aufbewahrten Probe deutlich geringer. Nach 5 Tagen war noch über 60 % der Anfangsaktivität vorhanden, nach 21 Tagen 25 %. $t_{1/2}$ errechnete sich hier zu 10,2 d.

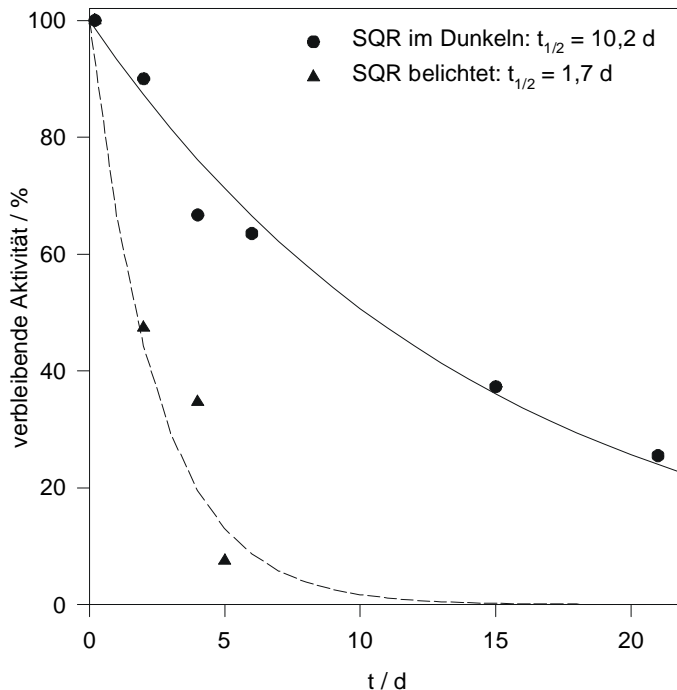


Abb. 5.11. Lichtabhängigkeit der SQR-Stabilität bei Raumtemperatur. Aufgetragen ist die verbleibende Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit für im Dunkeln und unter einer 60 W-Lampe aufbewahrte SQR.

5.2.9. Redox Titration des Flavins in der SQR

Die SQR katalysiert die sulfidabhängige Reduktion von Chinon. Dabei weisen die Substrate eine Potentialdifferenz von fast 400 mV auf. Während die Oxidation von Sulfid zu elementarem Schwefel ein Mittelpunktspotential von -270 mV und die Oxidation von Sulfid zu Disulfid ein Potential von -200 mV hat (Brune, 1989), liegt das Potential für die Reduktion von UQ zu UQH₂ bei +120 mV (Thauer et al., 1977). Über die dabei ablaufenden Teilreaktionen in der SQR lagen bisher noch keine Daten vor. Deshalb sollte zum einen die Lage des Mittelpunktspotentials der prosthetischen Gruppe FAD in der SQR bestimmt werden, um die Energetik der Reaktion zu verstehen. Zum anderen sollte überprüft werden, ob ein 2 e⁻ - Übergang zu beobachten ist oder ob die Aufspaltung der beiden 1 e⁻ -Potentiale so groß ist, daß die Semichinon-Form des Flavins in der SQR stabilisiert wird. Aus diesen Versuchen sollten dann Aussagen über den Mechanismus der Reaktion und die das FAD umgebende Proteinstruktur zu treffen sein.

Die Titration wurde bei pH 7,0 durchgeführt. **Abb. 5.12.** (S. 34) zeigt die Absorptionsänderungen der aufgenommenen SQR-Spektren bei verschiedenen Potentialen. Bei Reduktion erfolgte eine Abnahme der beiden Maxima bei 375 und 450 nm. Diese Änderung war bei anschließender Oxidation voll reversibel. Während der Titration auftretende Absorptionsbanden von Semichinon im Bereich um 380 nm (Semichinon-Anion, „rotes Semichinon“) oder um 600 nm (neutrales, „blaues Semichinon“) konnten nicht beobachtet werden.

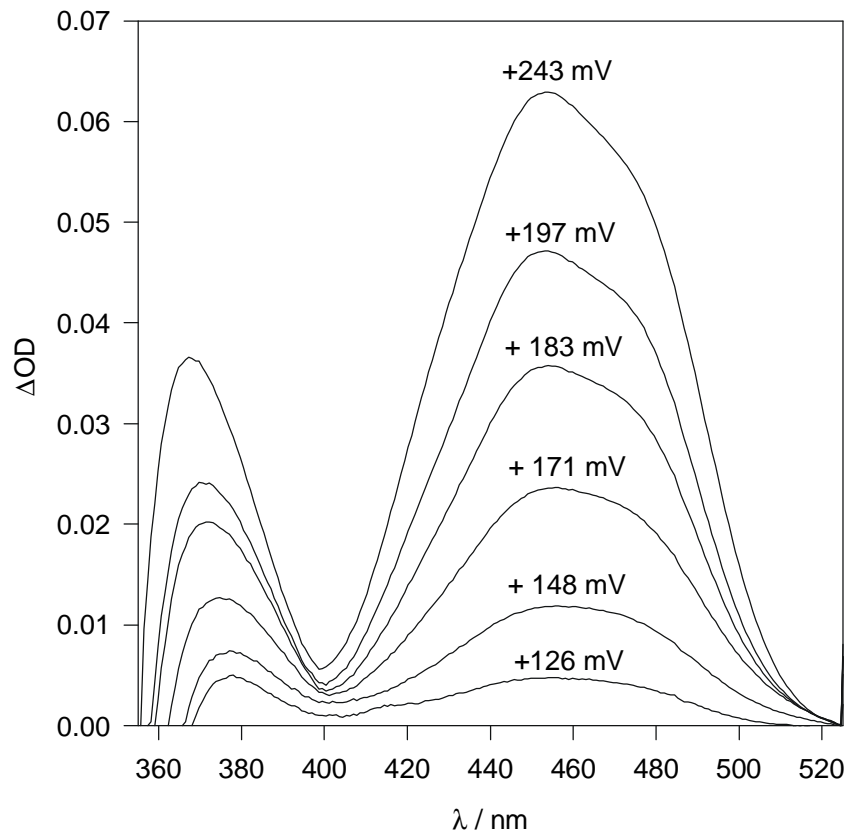


Abb. 5.12. Absorptionsspektrum der SQR während Reduktion / Oxidation. Gezeigt ist ein Teil der Differenzspektren, wobei das Spektrum des niedrigsten Potentials jeweils abgezogen wurde. Die Messungen erfolgten bei pH 7,0.

Die größte Änderung der Absorption während der Titration wurde bei 450 nm beobachtet, deshalb wurde diese Bande verwendet, um eine Auftragung gemäß der Nernst-Gleichung zur Ermittlung des Mittelpunktspotentials und der Zahl der übergehenden Elektronen vorzunehmen. Da aber auch die Mediatoren während der Titration eine Absorptionsänderung in diesem Bereich zeigten, wurde zuerst nur das Mediatorgemisch titriert. Die gemessenen Absorptionsänderungen wurden bei der Auswertung der SQR-Titration anschließend einberechnet.

Für die SQR wurden mehrere unabhängige Titrations jeweils in reduktiver und oxidativer Richtung durchgeführt. Die lineare und logarithmische Auftragung des Absorptionsmaximums bei 450 nm gegen das Potential ist in **Abb. 5.13.** (S. 35) gezeigt. Die Auswertung der linearen Auftragung wurde mit dem Fit-Programm der Software Microcal Origin auf Basis der Nernst-Gleichung durchgeführt, wobei der Anteil der Mediatoren an der Absorptionsänderung weniger als 5 % betrug. Hierbei ergab sich für die SQR bei pH 7,0 ein Mittelpunktspotential von +186 mV mit einem $2 e^-$ -Übergang. Diese Auswertung deckte sich mit der logarithmischen Auftragung. Die Beteiligung von 2 Elektronen war aufgrund der Eigenschaft der SQR, den $2 e^-$ -Überträger Chinon zu reduzieren, nicht überraschend.

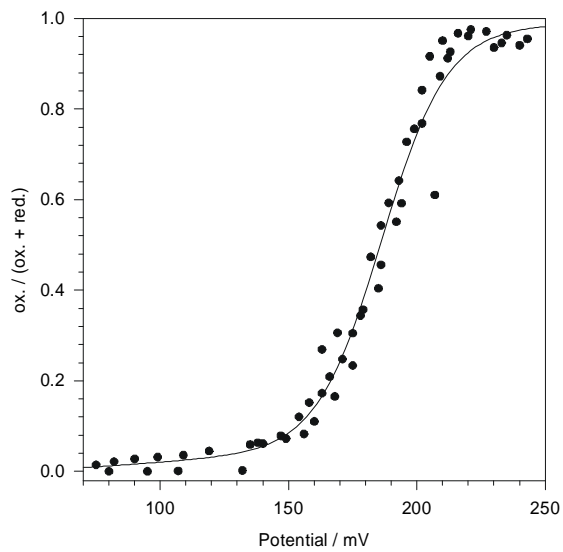
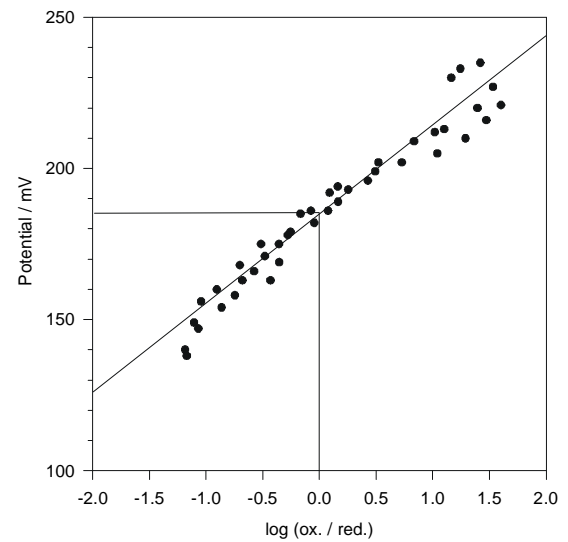
A Lineare Auftragung**B Logarithmische Auftragung**

Abb. 5.13. Redox titration der SQR. A Lineare Auftragung. B Logarithmische Auftragung. Für die Ermittlung des Anteils der oxidierten Form wurde die Absorptionsänderung bei 450 nm aufgetragen. Es wurde ein Mittelpunktspotential von +186 mV bei pH 7,0 mit einem $2 e^-$ - Übergang gemessen. Zur Auswertung der linearen Auftragung in **A** wurde eine Nernstgleichung zugrunde gelegt. ox.: oxidierte Form; red.: reduzierte Form.

5.3. Sequenzspezifische Mutagenese

Über den Mechanismus der sulfidabhängigen Chinonreduktion durch die SQR gibt es bislang nur wenige Daten. Deshalb sollte durch sequenzspezifische Mutagenese die Beteiligung verschiedener Aminosäuren an der SQR-Reaktion überprüft werden. Anhand von veränderten Eigenschaften der mutierten SQRs sollten dann Aussagen über die Funktion der entsprechenden Aminosäure getroffen werden können. Für die Auswahl der Aminosäuren zur Mutagenese wurde ein Vergleich aller sieben bisher bekannten SQR-Aminosäuresequenzen untereinander und mit dem verwandten und gut untersuchten FCC herangezogen (s. **Abb. 4.3.**, S. 17f). Entscheidend war dabei die Konservierung einer Aminosäure innerhalb aller SQR-Sequenzen und die Lage dieser Aminosäure innerhalb eines der sechs SQR-typischen Bereiche. Zum anderen sollte der Vergleich mit FCC die Ähnlichkeiten bzw. Unterschiede zwischen SQR und FCC widerspiegeln. Da die Arbeit mit der SQR aus *Rb. capsulatus* durchgeführt wurde, bezieht sich die Numerierung der erwähnten Aminosäuren im Text jeweils auf diese SQR.

5.3.1. Cys127Ser, Cys159Ser und Cys353Ser

Cysteine stellen generell gute Kandidaten für eine Bindestelle des Substrats Sulfids an das Enzym dar, da die Sulfhydrylgruppe des Cysteins mit einem Sulfidmolekül ein Persulfid bilden könnte. In der SQR gibt es drei Cysteine, die in allen bisher bekannten SQR-Sequenzen konserviert sind und jeweils in einem SQR-Fingerprint-Bereich liegen (s. **Abb. 4.3.**, S. 17f). Ein Vergleich mit der Flavoproteinuntereinheit von FCC zeigt, daß zwei dieser drei Cysteine, nämlich Cys159 und Cys353, auch dort an den entsprechenden Positionen auftreten (s. **Abb. 5.14.**, S. 37). Diese beiden entsprechenden Cysteine 161 und 337 in FCC bilden dort eine redoxaktive Disulfidbrücke, die nahe am FAD positioniert ist (Chen et al., 1994). Das dritte in der SQR konservierte Cystein, Cys127, ist in FCC nicht vorhanden.

Die drei Cysteine wurden jeweils gegen Serin ausgetauscht, das eine ähnliche Größe, aber mit der Hydroxylgruppe anstatt der Sulfhydrylgruppe eine unterschiedliche Funktionalität aufweist.

A SQR-Fingerprint 1 - Cys127			B SQR-Fingerprint 2 - Cys159		
	: .** :			**:::** .**:*::**:	
<i>R. caps.</i>	EGHTQSI C HIDHAEAA	135	<i>R. caps.</i>	GPIIIGAAQ G AS C FGPAYEF	166
<i>S. putre.</i>	EGFTQSI C TIDHAEKA	135	<i>S. putre.</i>	GPVVVGAL Q GAS C FGPAYEY	166
<i>T. ferro.</i>	EGPVQSI C TVDHAERA	136	<i>T. ferro.</i>	GPIVIGAM A GAS C FGPAYEY	167
<i>A. aeol.</i>	EENSTSI C TAEHALET	132	<i>A. aeol.</i>	GPVVIGAIP G V S CFGPAYEF	163
<i>O. lim.</i>	NGYTQSV C NP H HALMA	135	<i>O. lim.</i>	GPLVVGAV P GAS C FGPAYEF	166
A.7120	-GYTQSV C NP H HA I KA	134	A.7120	GPLVVGAL P K T S C LGPAYEF	165
<i>A. halo.</i>	EGYTQSV C NA H HAEMA	136	<i>A. halo.</i>	GPLL V GAV P GAS C MGPAYEF	167
FCC	AKLPHAW K AGE Q TAIL	167	FCC	TVVIAP P A P FR C PPGPYER	198
	: .::		: : . * .**		
C SQR-Fingerprint 5 - Cys353					
	::*:*:*:				
<i>R. caps.</i>	AVCLAD F GDKG	361			
<i>S. putre.</i>	AICLAD M GDKG	362			
<i>T. ferro.</i>	AVCFAD M GDRG	364			
<i>A. aeol.</i>	AICIAD F GEDA	355			
<i>O. lim.</i>	AICIAD F GDTG	352			
A.7120	AICFAD F GNSG	351			
<i>A. halo.</i>	AICMAD F GDTG	353			
FCC	NTCYS I LAPAY	375			
	* : : .				

Abb. 5.14. Alignments der Bereiche um die 3 konservierten Cysteine. Zu den Abkürzungen und Quellen der Sequenzen und den verwendeten Homologie-Symbolen s. **Abb. 4.3.**, S. 17f. **A** Fingerprint-Bereich 1 um Cys127. **B** Fingerprint-Bereich 2 um Cys159. **C** Fingerprint-Bereich 5 um Cys353.

5.3.1.1. Komplementation der *sqr*⁻ - Mutante *Rb. capsulatus* F14

Als erster Test der Funktion des so veränderten Genprodukts wurden die mutierten *sqr*-Gene durch Konjugation in die *sqr*⁻ - Mutante *Rb. capsulatus* F14 eingebracht, die aufgrund der Deletion des *sqr*-Gens nicht mehr in der Lage ist, mit Sulfid als einzigem Elektronendonator zu wachsen (Schütz et al., 1999). **Abb. 5.15.** (S. 38) zeigt die Fähigkeit der solchermaßen komplementierten Stämme, mit Sulfid zu wachsen. Bei keinem der mit einer Cystein-Serin-Mutation komplementierten Stämme konnte Wachstum mit Sulfid als einzigem Elektronendonator beobachtet werden, während Komplementation mit dem Wildtyp-Gen diese Fähigkeit wiederherstellt. Wachstum war jedoch wieder möglich, wenn außer Sulfid noch Malat als Elektronendonator zur Verfügung stand. Hierbei zeigte sich auf der Zelloberfläche bei dem mit dem Wildtyp (wt)-Gen komplementierten Stamm ein gelblich-weißer Überzug, der aus Elementarschwefel bestand (s. Abschnitt 5.4.3., S. 53) und bei den Stämmen mit den mutierten Genen nicht auftrat. Komplementation des Wildtyp-Stamms von *Rb. capsulatus* mit einem mutierten *sqr*-Gen zeigte keinen erkennbaren Phänotyp, was den Schluß zuläßt, daß die mutierten *sqr*-Gene nicht toxisch für *Rb. capsulatus* sind, sondern nur für ein inaktives Genprodukt kodieren.

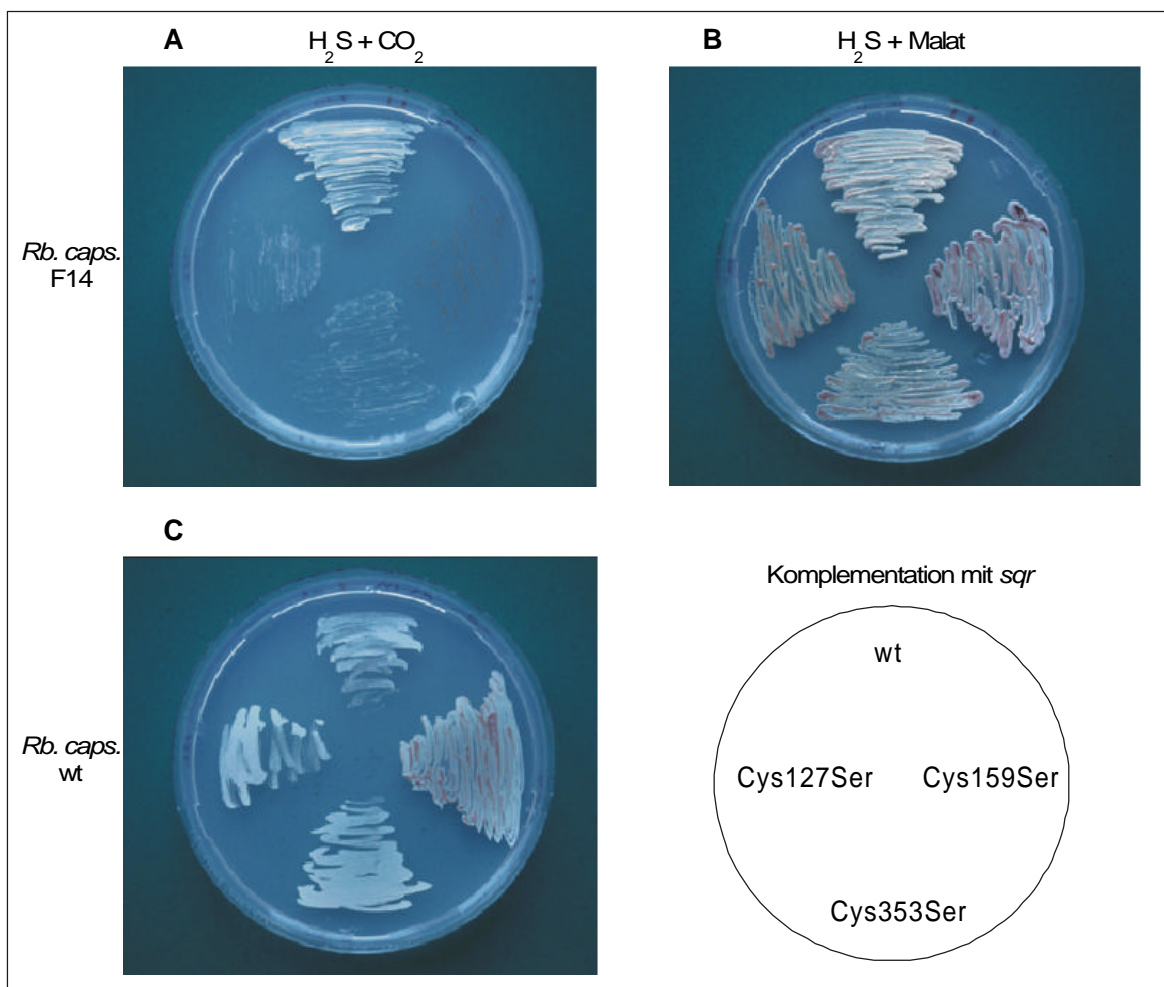


Abb. 5.15. Wachstum von *Rb. capsulatus* mit den mutierten *sqr*-Genen und dem *sqr*-Wildtyp (wt)-Gen. A und B zeigen den *sqr*⁻ Stamm F14, C den komplementierten *Rb. capsulatus*-Wildtyp-Stamm. In A und C erfolgte der Versuch mit Sulfid als einzigem Elektronendonator, in B waren Sulfid und Malat anwesend. Deutlich zu erkennen ist die Ausbildung eines gelblich-weißen Überzugs bei Stämmen, die ein intaktes *sqr*-Gen besitzen, im Gegensatz zu der rötlichen Farbe von Kulturen mit defektem *sqr*-Gen.

Eine genauere Analyse des Wachstumsverhaltens wurde in Flüssigkultur durchgeführt. Hierbei wurden Wachstum und Sulfidverbrauch von F14 und der komplementierten Stämme in Malat-Medium untersucht. Dabei zeigte der mit dem Wildtyp (wt)-Gen komplementierte Stamm einen deutlich höheren Sulfidverbrauch als F14 ohne zusätzliches Gen und in Anwesenheit der mutierten Gene. Die Abnahme der Sulfidkonzentration, die auch bei diesen Stämmen auftrat, ist auf die chemische Oxidation von Sulfid durch Sauerstoff zurückzuführen. Beim Wachstum dagegen war kein Unterschied zwischen den Stämmen festzustellen (s. **Abb. 5.16.**, S. 39). Damit war das Verhalten der Stämme mit den mutierten Genen identisch zu dem Ausgangsstamm F14, der Sulfid als Elektronendonator nicht benutzen kann, aber im Bereich bis 0,8 mM keine erhöhte Sensitivität gegenüber Sulfid aufweist verglichen mit dem *Rb. capsulatus*-Wildtyp (Schütz et al., 1999).

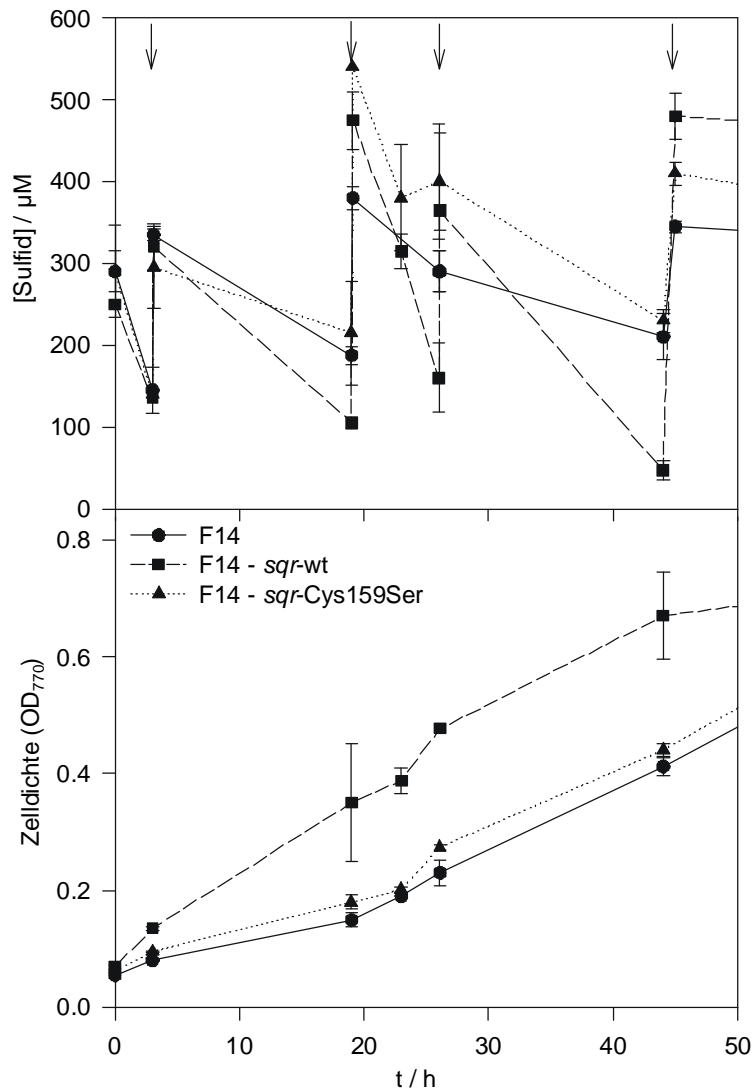


Abb. 5.16. Wachstum (unten) und Sulfidverbrauch (oben) von *Rb. capsulatus* F14 mit und ohne Komplementation mit dem *sqr*-Gen. Für die mutierten *sqr*-Gene ist nur *sqr*-Cys159Ser gezeigt, die beiden anderen Cystein-Serin-Mutationen zeigten den gleichen Effekt. Die Pfeile markieren jeweils die Zeitpunkte, an denen weiteres Sulfid zugegeben wurde. Nach jeder Sulfidzugabe wurde die Konzentration erneut gemessen. Für jede Versuchsreihe wurden Messungen an 3 unabhängigen Kulturen ausgewertet.

5.3.1.2. Untersuchungen am isolierten Enzym

Für Studien am isolierten Enzym wurden die drei mutierten *sqr*-Gene heterolog in *E. coli* exprimiert und gereinigt, wie in 5.1. (S. 22f) beschrieben. Zur Charakterisierung wurde der FAD-Gehalt der Präparationen bestimmt. Die Werte lagen im gleichen Bereich (5 - 25 %) wie beim Wildtyp-Protein (s. 5.2.3., S. 26), ein Trend zu höheren oder niedrigeren FAD-Gehalten war nicht erkennbar. Die spezifische Aktivität war bei allen mutierten Enzymen dramatisch reduziert, aber meßbar höher als die chemische Hintergrundreaktion, die bei 30°C nicht vorhanden war. SQR-Cys127Ser wies hierbei die höchste spezifische Aktivität von 0,74 U/mg auf, 1,3 % der Wildtyp-Aktivität. Für Cys159Ser lag die Aktivität bei 0,27 U/mg (0,5 %), für Cys353Ser bei 0,23 U/mg (0,4 %) (s. **Tab. 5.2.**, S. 42). Nur bei Cys127Ser war die Aktivität hoch genug für eine Bestimmung des K_M -Werts für Sulfid (**Abb. 5.17.**, S. 40). Der ermittelte K_M von 3 μ M war im Vergleich zum Wildtyp (5 μ M) minimal erniedrigt. Somit zeigte sich für Cys127Ser die Affinität für Sulfid unverändert hoch.

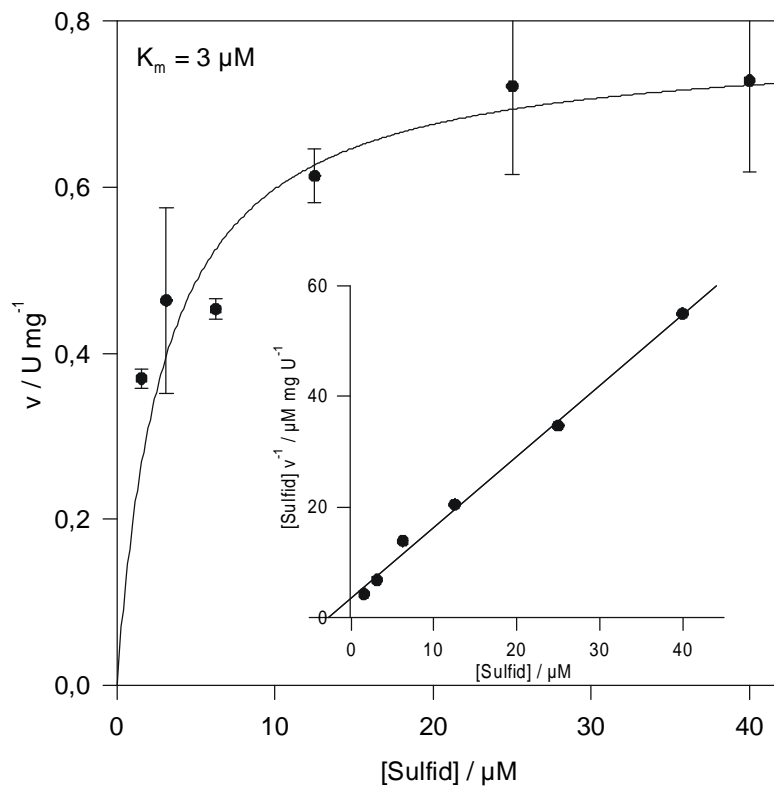


Abb. 5.17. SQR-Cys127Ser: K_M für Sulfid. Gezeigt sind die Auftragung nach Michaelis und Menten und nach Hanes (1932) (Einschub). Der K_M -Wert errechnete sich zu $3 \mu\text{M}$. Für jeden Meßpunkt wurde ein Mittelwert aus mindestens 3 Messungen errechnet.

Als Aktivitätstest, der die SQR-Reaktion in die beiden Teilreaktionen trennt, kann die Messung des sulfidabhängigen Fluoreszenzquench betrachtet werden. Da bei allen 3 mutierten Proteinen die Aktivität beinahe völlig verloren gegangen war, sollte die Fluoreszenzmessung Aufschluß darüber geben, welche Teilreaktion gehemmt ist, die sulfidabhängige Reduktion des oxidierten Enzyms oder die chinonabhängige Reoxidation des reduzierten Enzyms. **Abb. 5.18.** (S. 41) zeigt die Fluoreszenzspektren der mutierten Proteine. In allen Fällen waren die Spektren gegenüber dem Wildtyp-Spektrum unverändert, der sulfidabhängige Quench konnte jedoch bei keinem Protein beobachtet werden. Auch bei anaerober Durchführung des Versuchs, bei Sulfidkonzentrationen bis zu 1 mM und bei Wartezeiten bis zu 15 min nach Sulfidzugabe kam es zu keiner Veränderung der Fluoreszenz. Auch die Zugabe von dUQ führte zu keiner Änderung in den Fluoreszenzspektren. Damit war bei allen mutierten Proteinen offenbar die erste Teilreaktion, die sulfidabhängige FAD-Reduktion, blockiert.

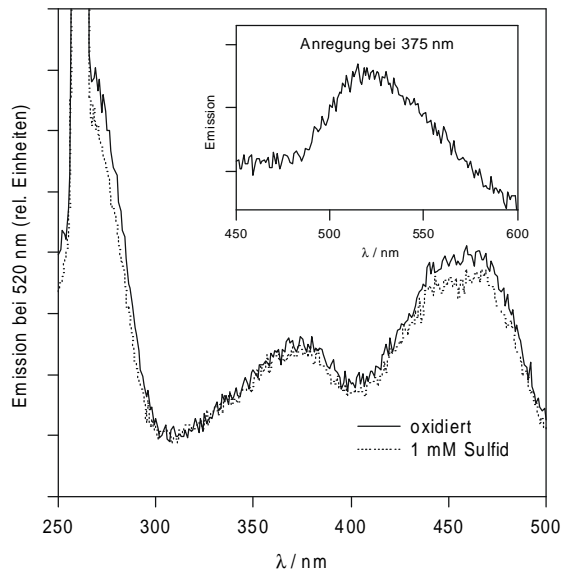
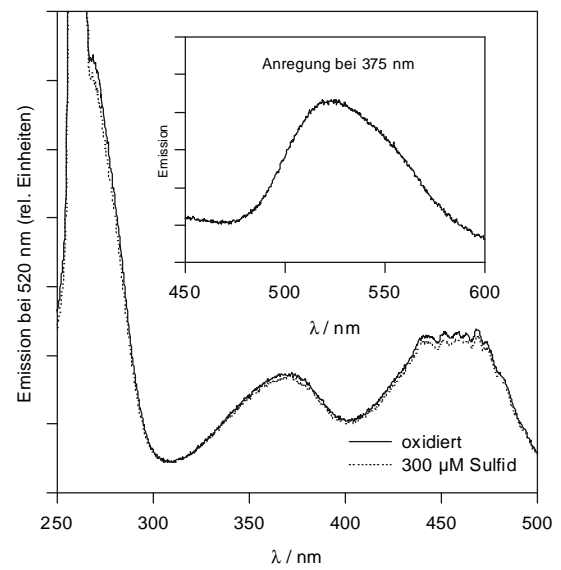
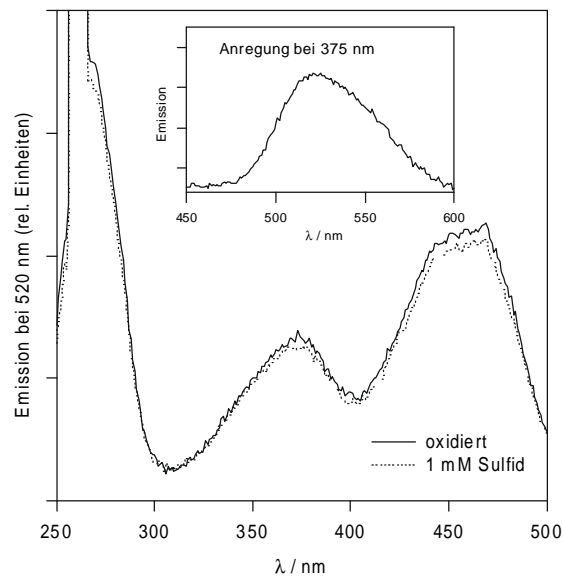
A SQR-Cys127Ser**B SQR-Cys159Ser****C SQR-Cys353Ser**

Abb. 5.18. Fluoreszenzspektren der mutierten SQR-Proteine **Cys127Ser (A)**, **Cys159Ser (B)** und **Cys353Ser (C)**. Die Emission wurde bei den Anregungsspektren bei 520 nm gemessen. Einschub: Emissionsspektrum bei Anregung mit 375 nm. Proteinkonzentration: jeweils 0,2 mg/ml. Die Spektren des Puffers wurden jeweils abgezogen.

Tab. 5.2. (S. 42) faßt die Ergebnisse der Untersuchungen an den drei Cystein-Serin-Mutationen zusammen.

Tab. 5.2. Auswirkungen der Mutationen Cys127Ser, Cys159Ser und Cys353Ser im Vergleich zum Wildtyp (wt). + : positiv; - : negativ; / : nicht bestimmbar.

SQR	Komplementa- tion von F14: Wachstum auf Sulfid	spez. Akt. (U mg ⁻¹)	Aktivität im Vergleich mit wt (%)	K _M für Sulfid (μM)	Fluoreszenz- quench durch Sulfid
wt	+	50 - 55	(100)	5	+
Cys127Ser	-	0,74	1,3	3	-
Cys159Ser	-	0,27	0,5	/	-
Cys353Ser	-	0,23	0,4	/	-

5.3.2. Val300Asp

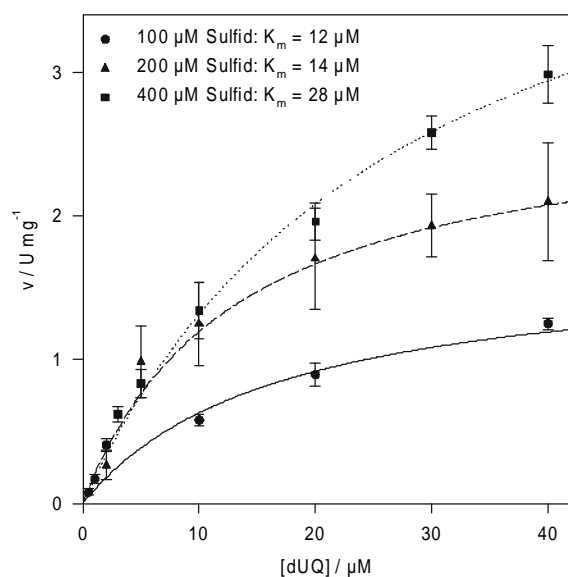
Innerhalb der dritten Flavinbindedomäne der Flavoproteine der Glutathion Reduktase-Familie zeigt die SQR eine Besonderheit (s. Abschnitt 4.2.2.2., S. 15f). Während bei den anderen Mitgliedern dieser Familie ein Aspartat konserviert vorliegt (Asp324 in FCC), das dort mit der Ribityl-Einheit des FAD wechselwirkt (Van Driessche et al., 1996), weist keine der bisher bekannten SQR-Sequenzen dieses Aspartat auf. Stattdessen liegt dort ein Valin (Val300 in der SQR von *Rb. capsulatus*), mit Ausnahme der SQR von *Thiobacillus ferrooxidans*, die dort ein Isoleucin zeigt. Dieser Unterschied scheint ein typisches Merkmal der SQR gegenüber anderen Flavoproteinen dieser Familie zu sein. Der Grund dafür ist bisher nicht bekannt, möglicherweise liegt das FAD in der SQR in einer anderen Konformation vor. Eine interessante Beobachtung dazu konnte bei einem Gen aus Hefe gemacht werden. Aus der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* wurde ein Gen isoliert, das für ein Protein mit SQR-Aktivität kodiert (Vande Weghe und Ow, 1999). Dieses HMT2 genannte Protein wurde als die erste eukaryotische SQR postuliert. Allerdings weist dieses Enzym für die beiden Substrate Sulfid und Chinon jeweils einen K_M-Wert von 2 mM auf, während alle bisher untersuchten SQR-Enzyme Werte im mikromolaren Bereich haben (Griesbeck et al., 2000), was die Funktion dieses Enzyms als SQR in Frage stellt, da die Hefe solch hohe Sulfidkonzentrationen nicht toleriert und das Enzym bei geringeren Konzentrationen nicht mit der größtmöglichen Umsatzrate arbeitet. Möglicherweise wurde hier mit der SQR-Reaktion eine artifizielle Aktivität beobachtet (vgl. Abschnitt 4.2.4., S. 19f). Interessanterweise weist dieses HMT2-Protein, das über die gesamte Länge Homologie zur Glutathion Reduktase-Familie der Flavoproteine zeigt, innerhalb der dritten Flavinbindedomäne das Aspartat auf, was die Funktion von HMT2 als SQR nochmals in Frage stellt (**Abb. 5.19.**, S. 43).

<i>R. caps.</i>	GFVIVDQH-QQNPTFKNVFAVGVCVAIPP	306
<i>S. putre.</i>	GFVLTDTF-QRSPRYPEIYAAGVCVAVPP	306
<i>T. ferro.</i>	GFVLVDEH-QRSKKYANIFAAGIAIAIPP	308
<i>A. aeol.</i>	KMVIVNRC-FQNPTYKNIFGVGVVTAIPP	300
<i>O. lim.</i>	GFVPTNT-YQHPKYESVYSAGVIVEINP	297
A.7120	GFIPVLPT-YRHPEYASIIYAVGVVVEIKP	296
<i>A. halo.</i>	GFLPVLDT-YQHPDYPSIYSAGVITQLAA	298
HMT2	GFVAVDQSTTQSTKFPNVFAIGDCSGLPT	346
FCC	-WCPVDIKTFESSIHKGIHVIGDAC---I	327
GR	GHIIVDE--FQNTNVKGIYAVGDVCGKAL	337
LipDH	GFIYVDD--YCATSVPGVYAIGDVVRGAM	325

Abb. 5.19. Alignment der dritten Flavinbindedomäne. Zu den Abkürzungen und Quellen der Sequenzen s. **Abb. 4.3.**, S. 17f. Zusätzlich wurden hier verwendet: HMT2 (*S. pombe*; Vande Weghe und Ow, 1999), GR (Glutathion Reduktase des Menschen; Krauth-Siegel et al., 1982), LipDH (Lipoamid Dehydrogenase von *Azotobacter vinelandii*; Westphal und deKok, 1988). Zur Verwendung der Homologie-Symbole: s. **Abb. 4.3.**, S. 17f. Die Symbole sind für die SQR-Sequenzen oberhalb und für alle Sequenzen unterhalb angegeben.

Um die Funktion des Valinrests in der SQR gegenüber dem Aspartatrest der anderen Mitglieder dieser Familie zu untersuchen, wurde Valin300 zu Aspartat mutiert. Für die SQR-Val300Asp wurde als erste Kenngröße die spezifische Aktivität ermittelt. Mit ca. 6 U/mg lag diese nur bei ca. 11 % verglichen mit dem Wildtyp. Der FAD-Gehalt der Präparationen lag im gleichen Bereich wie der des Wildtyps (5-25 %, s. 5.2.3., S. 26). Der K_M -Wert für dUQ wurde für 3 verschiedene Sulfid-Konzentrationen ermittelt. Bei konstanten Sulfid-Konzentrationen von 100, 200 und 400 μM wurden K_M -Werte von 12, 14 bzw. 28 μM ermittelt (**Abb. 5.20.**), was eine deutliche Verschlechterung der Affinität zu dUQ verglichen mit dem Wildtyp ($K_M = 3 \mu\text{M}$) bedeutet.

A Michaelis-Menten-Plot



B Hanes-Plot

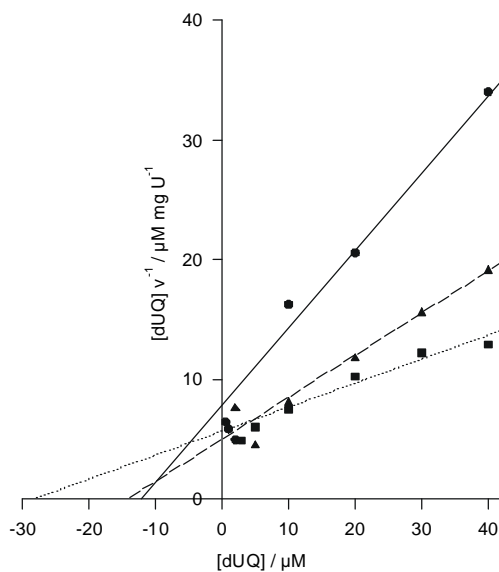


Abb. 5.20. SQR-Val300Asp: K_M für dUQ bei verschiedenen Sulfid-Konzentrationen. Der K_M für dUQ wurde jeweils bei 100, 200 und 400 μM Sulfid bestimmt. Da selbst eine Konzentration von 400 μM Sulfid noch nicht sättigend war (s. **Abb. 5.21.**, S. 44), liegt der tatsächliche K_M -Wert für dUQ noch höher als 28 μM . **A** Auftragung nach Michaelis und Menten. **B** Auftragung nach Hanes (1932). Für jeden Meßpunkt wurde ein Mittelwert aus mindestens 3 Messungen errechnet.

Diese Abhängigkeit des K_M -Werts für dUQ von der Sulfidkonzentration war ein Zeichen dafür, daß die vorgegebenen Sulfidkonzentrationen bis zu 400 μM noch nicht im Sättigungsbereich lagen, d.h. der tatsächliche K_M -Wert für dUQ noch oberhalb von 28 μM liegen sollte. Deshalb wurde als nächster Parameter der K_M für Sulfid bestimmt. Hierbei ergab sich das Problem, daß bei einem ermittelten K_M für dUQ von über 28 μM (s.o.) die Sättigungskonzentration im Bereich von mindestens 100 μM liegen dürfte, in einen Aktivitätstest aber aufgrund der schlechten Löslichkeit von dUQ in wässrigen Lösungen nur maximal 40 μM eingesetzt werden können (s. Abschnitt 5.2.1.1., S. 24f). Deshalb wurde auch die Bestimmung des K_M -Werts für Sulfid nicht in Gegenwart von sättigenden Konzentrationen des zweiten Substrats dUQ durchgeführt. In Gegenwart einer konstanten Konzentration von 40 μM dUQ wurde der K_M für Sulfid mit 400 μM bestimmt (s. **Abb. 5.21.**), verglichen mit 5 μM beim wt-Enzym. Auch in diesem Fall sollte der tatsächliche Wert noch höher liegen.

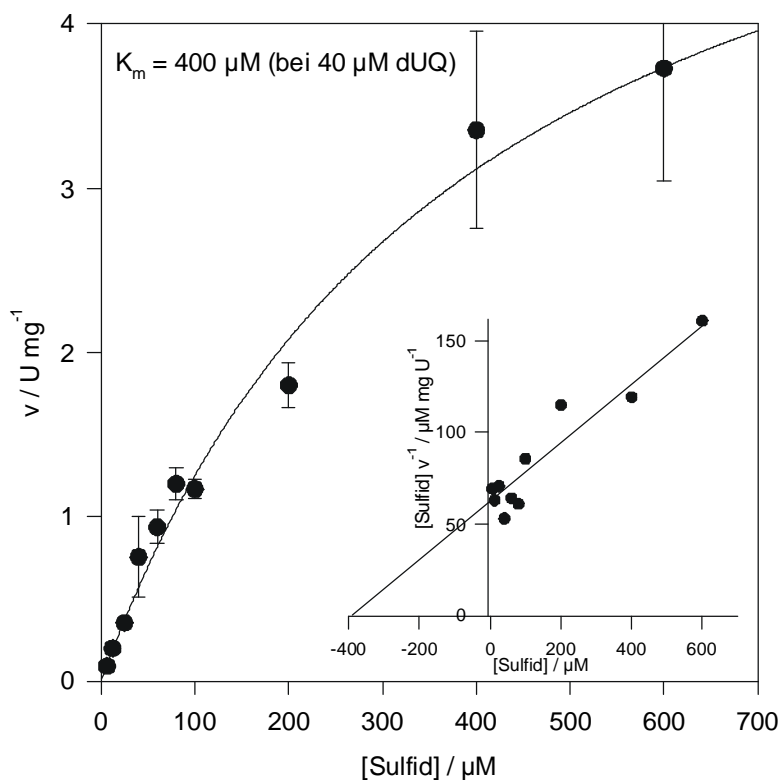


Abb. 5.21. SQR-Val300Asp: K_M für Sulfid. Der K_M für Sulfid wurde in bei einer konstanten dUQ-Konzentration von 40 μM bestimmt, die nicht sättigend war (s. **Abb. 5.20.**, S. 43), aber aufgrund der begrenzten Löslichkeit von dUQ in wässrigen Lösungen nicht überschritten werden kann (s. 5.2.1.1., S. 24f). Einschub: Auftragung nach Hanes (1932). Für jeden Meßpunkt wurde ein Mittelwert aus mindestens 3 Messungen errechnet.

Obwohl für beide Substrate aus technischen Gründen nicht die exakten K_M -Werte ermittelt werden konnten, zeigen diese Messungen deutliche Mindeständerungen der Substrataffinitäten, die tatsächlichen Änderungen verglichen mit dem Wildtyp liegen noch höher. Hierbei war bei der Affinität für Sulfid eine Veränderung um zwei Größenordnungen festzustellen, der K_M für dUQ änderte sich dagegen nur im Rahmen einer Größenordnung.

Das Fluoreszenzspektrum von SQR-Val300Asp (**Abb. 5.22.**, S. 45) zeigte keine Veränderungen gegenüber dem Wildtyp. Zur vollen Reduktion des FAD, die durch die Abnahme der Fluoreszenz dokumentiert wird, waren allerdings Konzentrationen von 200 μM Sulfid nötig, zur Reoxidation entsprechend stöchiometrische Mengen an dUQ.

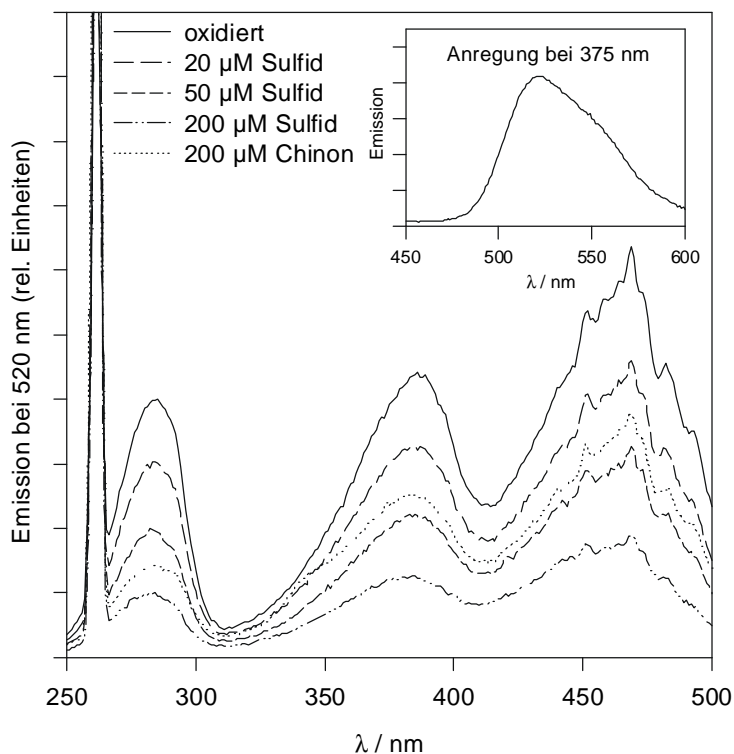
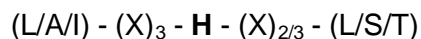


Abb. 5.22. Fluoreszenzspektrum der SQR-Val300Asp. Die Emission wurde bei den Anregungsspektren bei 520 nm gemessen. Einschub: Emissionsspektrum bei Anregung mit 375 nm. Proteinkonzentration: 0,2 mg/ml. Die Spektren des Puffers wurden jeweils abgezogen.

5.3.3. His131Ala und His196Ala

Durch den Vergleich der Kristallstrukturen verschiedener Chinon-bindender Proteine wurden von Rich und Fisher (1999) Sequenzmotive von Chinonbindestellen charakterisiert und klassifiziert. Ein von ihnen so genanntes Typ1-Motiv besteht aus einem helikalen Bereich, der eine Seite des Chinons flankiert und eine Triade von Aminosäuren beinhaltet, die in nahem Kontakt zu dem gebundenen Chinon steht. Die zentrale Aminosäure der Triade stellt ein Histidin dar, das eine Wasserstoffbrücke zu einer Carbonylgruppe des Chinon bildet. 4 Aminosäuren davor befindet sich eine aliphatische Aminosäure, meist Leucin, die die Isopren-Seitenkette des Chinons bindet. Die Triade wird vervollständigt durch eine weitere aliphatische oder polare Aminosäure 3 oder 4 Positionen nach dem Histidin, und zwar Leucin, Serin oder Threonin. Das Typ1-Bindemotiv stellt sich also insgesamt folgendermaßen dar:



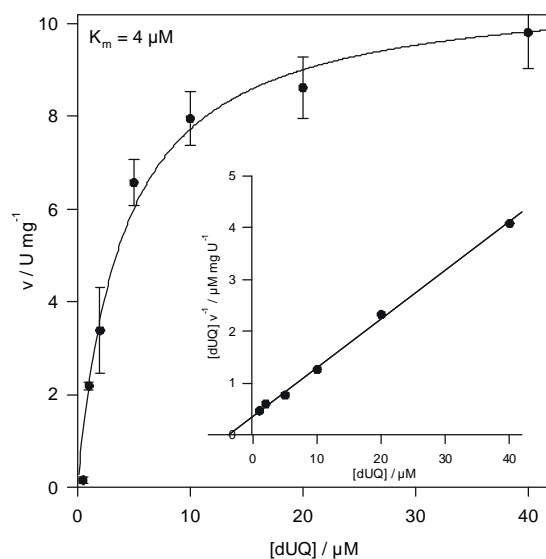
In der SQR gibt es 2 Histidine, die in allen SQR-Sequenzen konserviert sind und jeweils in einem SQR-Fingerprint-Bereich liegen (s. **Abb. 4.3.**, S. 17f). **Abb. 5.23.** (S. 46) zeigt für beide Histidine das Alignment und die jeweiligen Consensus-Motive. Hierbei zeigt sich für keines der Motive perfekte Übereinstimmung mit dem von Rich und Fisher (1999) postulierten Motiv. In beiden Fällen aber ist das zentrale Histidin flankiert von konservierten aliphatischen Aminosäuren, die im Abstand von 2-4 Aminosäuren vor und nach dem Histidin positioniert sind. Darüberhinaus zeigt der Vergleich mit FCC, das keine Chinonbindestelle aufweist, in diesem Bereich keinerlei Übereinstimmung, insbesondere steht in beiden Fällen ein Glutamin-Rest anstelle des Histidins.

A SQR-Fingerprint 1 - His131			B SQR-Fingerprint 3 - His196		
	*** .** :			***:*** **::	
<i>R.caps.</i>	EGHTQSICHIDHAEAA	135	<i>R.caps.</i>	TFVTSEPYVGHHLGL	199
<i>S.putre.</i>	EGFTQSICTIDHAEKA	135	<i>S.putre.</i>	TFVTSEPYVGHMGL	199
<i>T.ferro.</i>	EGPVQSICTVDHAERA	136	<i>T.ferro.</i>	TFITSEPYIGHLGI	201
<i>A.aeol.</i>	EENSTSICTAEHALET	132	<i>A.aeol.</i>	TFITSEPYLGHFGV	196
<i>O.lim.</i>	NGYTQSVCPNPHHALMA	135	<i>O.lim.</i>	TFVTPEPYVGHHLGI	199
A.7120	-GYTQSVCPNPHHAIKA	134	A.7120	TFVTPEPYAGHLGI	198
<i>A.halo.</i>	EGYTQSVCPNAHHAEMA	136	<i>A.halo.</i>	TFISPEPYLGHHLGI	200
FCC	AKLPHAWKAGEQTAIL	167	FCC	DSSQTFSKQSQFSK	232
	: .::			. . .:::	
C SQR-Consensus um His131			D SQR-Consensus um His196		
S - (I/V) - C - (X) ₃ - H - A - (X) ₂ - (A/T)			E - P - Y - (V/I/L/A) - G - H - (L/M/F) - G - (L/I/V)		

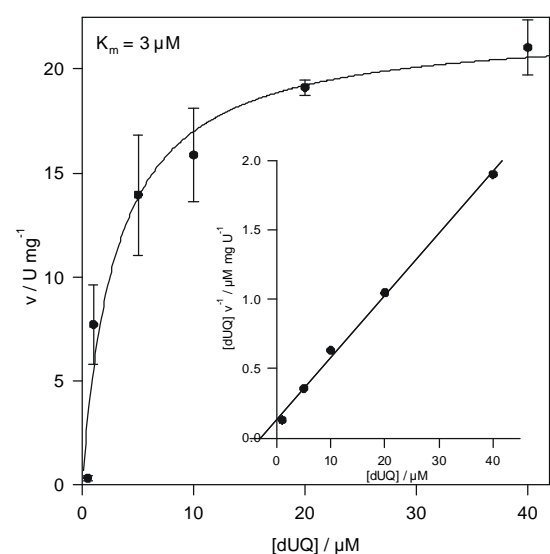
Abb. 5.23. Alignment der konservierten Bereiche um His131 (A) und His196 (B). Zu den Abkürzungen und Quellen der Sequenzen und den verwendeten Homologie-Symbolen s. **Abb. 4.3.**, S. 17f. Zur Verdeutlichung sind die Consensus-Motive in **C** (His131) und **D** (His196) noch einmal dargestellt.

Beide Histidine wurden jeweils gegen Alanin ausgetauscht, das aufgrund des aliphatischen Charakters die Proteinstruktur nicht zu sehr verändern sollte. Die spezifische Eigenschaft des Histidins (gemäß dem Modell von Rich und Fisher (1999)) der Wasserstoffbrückenbildung zu der Carbonylgruppe des Chinons sollte durch diese Mutation beseitigt werden. Da sich eine Mutation der zentralen Chinon-bindenden Aminosäure Histidin am ehesten in einer Veränderung der Affinität für Chinon messen lassen sollte, wurde der K_M -Wert von SQR-His131Ala und SQR-His196Ala für dUQ bestimmt (**Abb. 5.24. A, B**). Hierbei zeigte sich mit Werten von 4 bzw. 3 μM keinerlei Unterschied zum Wildtyp (3 μM). Die Affinität für Sulfid war jedoch in beiden Fällen etwas geringer als beim Wildtyp. SQR-His131Ala wies einen K_M von 11 μM auf, SQR-His196Ala einen K_M von 15 μM verglichen mit 5 μM beim Wildtyp (**Abb. 5.24. C, D**, S. 47).

A His131Ala: K_M für dUQ



B His196Ala: K_M für dUQ



(Fortsetzung: s. S. 47)

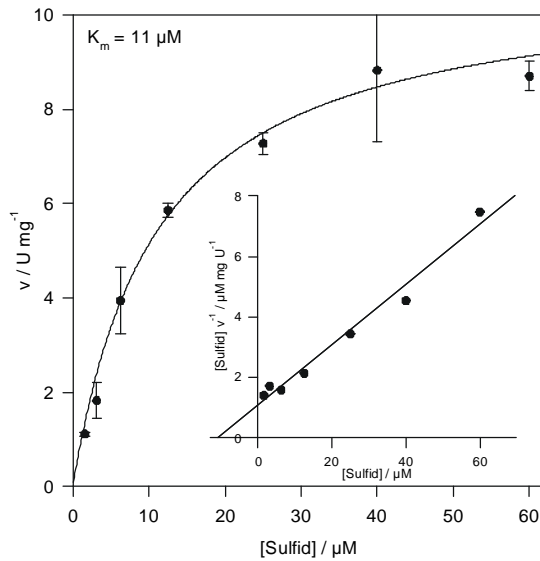
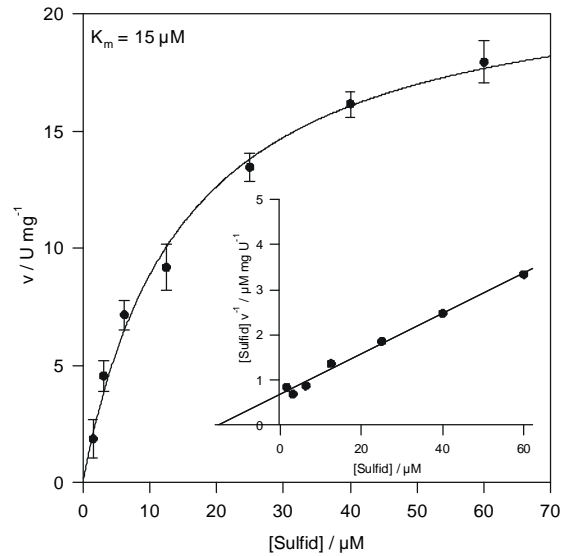
C His131Ala: K_M für Sulfid**D His196Ala: K_M für Sulfid**

Abb. 5.24. K_M -Bestimmung von His131Ala und His196Ala für dUQ und Sulfid. Es sind jeweils die Auftragung nach Michaelis und Menten und die linearisierte Auftragung nach Hanes (1932) (Einschub) gezeigt. **A** His131Ala: K_M für dUQ (s. S. 46). **B** His196Ala: K_M für dUQ (s. S. 46). **C** His131Ala: K_M für Sulfid. **D** His196Ala: K_M für Sulfid. Für jeden Meßpunkt wurde ein Mittelwert aus mindestens 3 Messungen errechnet.

Isoliertes Histidin weist einen pK-Wert von 6,5 auf und kann somit bei neutralem pH sowohl protoniert als auch deprotoniert vorliegen. Somit könnte ein Histidin auch an einer Protonierungsreaktion während der enzymatischen Katalyse der SQR beteiligt sein. Beispiele für die Beteiligung von Histidinen an enzymatischen Reaktionen durch Säure-/Basekatalyse finden sich auch innerhalb der Glutathion Reduktase-Familie (Williams Jr., 1992). Eine Mutation in einem Histidin sollte somit eine Veränderung der pH-Abhängigkeit der Reaktion nach sich ziehen. **Abb. 5.25.** (S. 48) zeigt die pH-Abhängigkeit der SQR-His131Ala und der SQR-His196Ala im Vergleich zum Wildtyp. Während sich das pH-Optimum der SQR-His196Ala geringfügig von 6,7 auf 6,2 verschoben hatte, zeigte SQR-His131Ala eine gravierende Verschiebung des pH-Optimums um 2 pH-Einheiten auf 4,5.

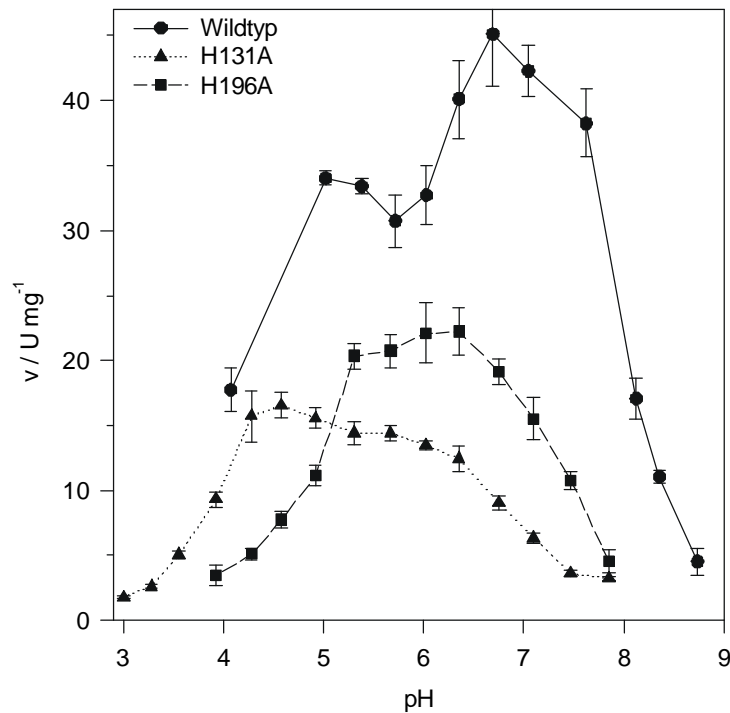
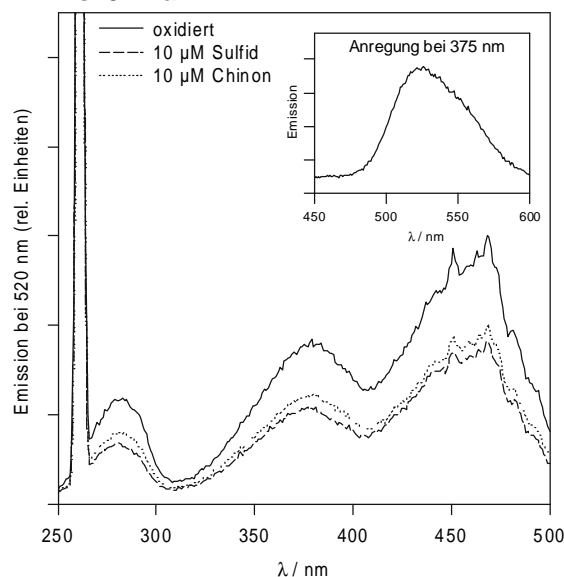


Abb. 5.25. pH-Abhängigkeit der SQR-Aktivität bei His131Ala und His196Ala verglichen mit dem Wildtyp. Es wurde jeweils die spezifische Aktivität als Funktion des pH aufgetragen. Die Messungen erfolgten bei 30°C. Für jeden Meßpunkt wurde ein Mittelwert aus mindestens 3 Messungen errechnet.

Die Fluoreszenzspektren der beiden mutierten Proteine zeigten sich nicht verändert, auch die Abnahme der Fluoreszenz bei Reduktion mit Sulfid konnte beobachtet werden. Allerdings konnte bei der SQR-His131Ala die Fluoreszenz bei Zugabe von dUQ nur in geringem Ausmaß wiederhergestellt werden, während die SQR-His196Ala zum Wildtyp identische Fluoreszenzeigenschaften aufwies (**Abb. 5.26.**).

A His131Ala



B His196Ala

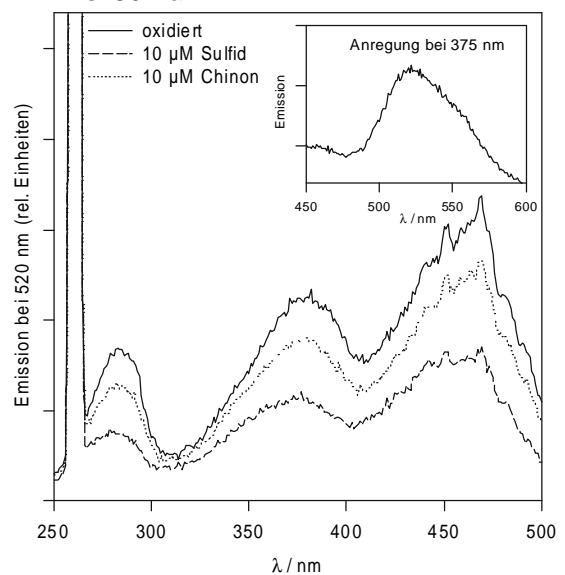


Abb. 5.26. Fluoreszenzspektren von His131Ala (A) und His196Ala (B). Die Emission wurde bei den Anregungsspektren bei 520 nm gemessen. Einschub: Emissionsspektrum bei Anregung mit 375 nm. Proteinkonzentration: jeweils 0,2 mg/ml. Die Spektren des Puffers wurden jeweils abgezogen.

Wie aus **Abb. 5.25.** (S. 48) zu ersehen ist, war die spezifische Aktivität für beide mutierte Enzyme vermindert. SQR-His131Ala zeigte bei pH 6,5 nur eine spezifisch Aktivität von 11 U/mg, was ca. 20 % der Wildtyp-Aktivität entspricht. Beim pH-Optimum von 4,5 lag die Aktivität bei 15 U/mg (27 %). Die spezifische Aktivität der SQR-His196Ala betrug bei pH 6,2 22 U/mg (40 %), bei pH 6,5 21 U/mg (38 %) (s. **Tab. 5.3.**). Der FAD-Gehalt der Präparationen lag im gleichen Bereich wie der des Wildtyps (5-25 %, s. 5.2.3., S. 26).

5.3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der sequenzspezifischen Mutagenese

Tab. 5.3. faßt alle Ergebnisse der sequenzspezifischen Mutagenese im Überblick zusammen.

Tab. 5.3. Effekte der sequenzspezifischen Mutationen im Vergleich zum Wildtyp (wt). + : positiv; - : negativ; / : nicht bestimmbar; nd : nicht bestimmt.

SQR	A	B	C	D	E	F	G	H
wt	+	50 - 55	(100)	5	3	6,7	+	+
Cys127Ser	-	0,74	1,3	3	nd	nd	-	/
Cys159Ser	-	0,27	0,5	/	/	/	-	/
Cys353Ser	-	0,23	0,4	/	/	/	-	/
Val300Asp	nd	6	11	>400	>28	nd	+	+
His131Ala	nd	11 (pH 6,5) 15 (pH 4,5)	20 (pH 6,5) 27 (pH 4,5)	11	4	4,5	+	-
His196Ala	nd	21 (pH 6,5) 22 (pH 6,2)	38 (pH 6,5) 40 (pH 6,2)	15	3	6,2	+	+

A: Komplementation von *Rb. capsulatus* F14: Wachstum auf Sulfid

B: spezifische Aktivität (U/mg) bei pH 6,5 bzw. beim pH-Optimum

C: Aktivität im Vergleich mit dem Wildtyp (%)

D: K_M für Sulfid (μM)

E: K_M für dUQ (μM)

F: pH-Optimum

G: Fluoreszenzquench durch Sulfid

H: Komplette Wiederherstellung der Fluoreszenz durch dUQ

5.4. Bestimmung des Schwefelprodukts der SQR-Reaktion

Im Gegensatz zu anderen Sulfid-oxidierenden Mikroorganismen, die Sulfid bis zur Stufe des Sulfats oxidieren können, kann *Rb. capsulatus* Sulfid nur bis zum Elementarschwefel der Oxidationsstufe 0 oxidieren (Hansen und Van Gernerden, 1972). Diesen scheiden Kulturen extrazellulär als weißlich-gelben Niederschlag ab (s. **Abb. 5.15.**, S. 38). Elementarer Schwefel, der bei Raumtemperatur hauptsächlich in der orthorhombischen α -Form in Form von S_8 -Ringen vorliegt (Stuedel, 1996a), weist in Wasser von 25°C eine Löslichkeit von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ auf (Boulégué, 1978). Da die SQR auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran lokalisiert ist, muß das Schwefelprodukt der SQR-Reaktion in der Lage sein, aus dem Periplasma herauszudiffundieren, was im Fall von Elementarschwefel aufgrund der geringen Löslichkeit unwahrscheinlich erscheint. Deshalb sollte durch die hier dokumentierten Versuche überprüft werden, ob als unmittelbares Produkt der SQR-Reaktion lösliches Polysulfid entsteht, das im chemischen Gleichgewicht mit Elementarschwefel steht, wobei die Gleichgewichtslage von den Bedingungen, u.a. dem pH, abhängt. Aus dem Nachweis des Schwefelprodukts sollten Rückschlüsse auf den Mechanismus der Reaktion gezogen werden können.

5.4.1. Stöchiometrie der SQR-Reaktion

In der SQR-Reaktion wird Sulfid, welches Schwefel in der Oxidationsstufe -2 darstellt, oxidiert. Um zu überprüfen, daß einerseits das Schwefelprodukt nicht über die Oxidationsstufe 0 hinaus oxidiert wird und andererseits Disulfid, das die Oxidationszahl -1 trägt, nicht das Endprodukt darstellt, wurde die Stöchiometrie zwischen Chinon und Sulfid bestimmt. Dazu wurden unter anaeroben Bedingungen durch die SQR-Reaktion bei pH 6,5 40 μM dUQ mit bekannten, limitierenden Mengen an Sulfid reduziert. Die dUQ-Konzentration wurde dabei photometrisch verfolgt. Beinahe vollständige Reduktion des Chinons wurde mit einer äquimolaren Menge an Sulfid erreicht (**Abb. 5.27.**, S. 51). Durch 40 μM Sulfid wurden bei 5 Messungen im Durchschnitt $36,5 \pm 0,7 \mu\text{M}$ dUQ reduziert, eine fünfte Zugabe von 10 μM Sulfid führte zu vollständiger Reduktion von dUQ. Da die Reaktion unter anaeroben Bedingungen durchgeführt wurde, ist Oxidation des Sulfids durch O_2 auszuschließen, vielmehr konnte die Reduktion des $2 e^-$ - Akzeptors durch eine beinahe äquimolare Menge an Sulfid als Oxidation des Sulfids der Oxidationsstufe -2 bis zur Oxidationsstufe 0 betrachtet werden.

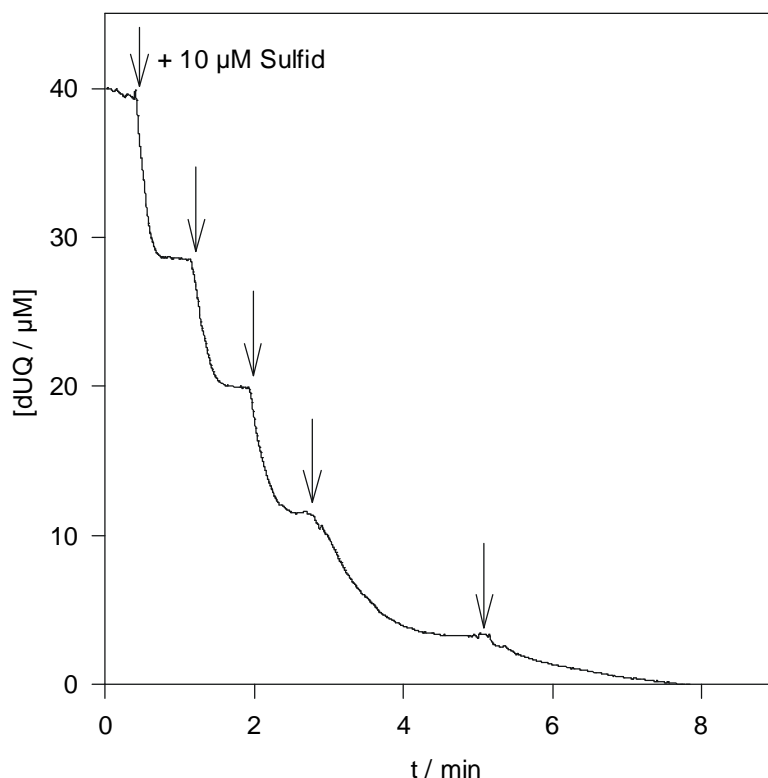


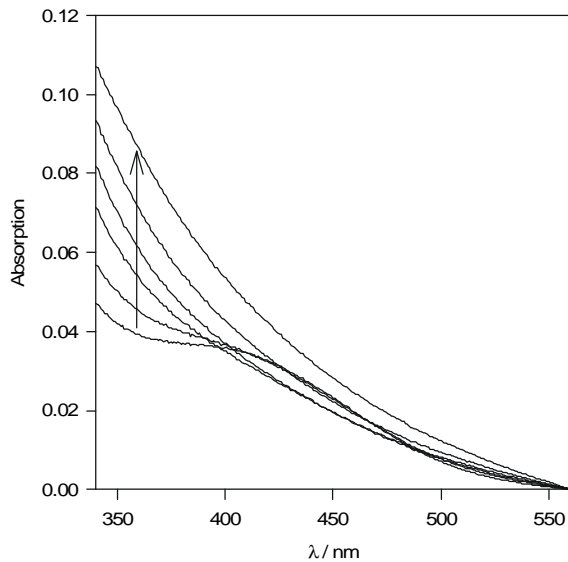
Abb. 5.27. Stöchiometrie der SQR-Reaktion. Unter anaeroben Bedingungen wurden bei pH 6,5 durch die SQR 40 μM dUQ mit 4 Zugaben von je 10 μM Sulfid (jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet) fast vollständig reduziert. Komplette Reduktion wurde durch eine fünfte Zugabe von 10 μM Sulfid erreicht. Die dUQ-Konzentration wurde photometrisch anhand der Differenz-Absorption 275-300 nm bestimmt.

5.4.2. Photometrische Polysulfidbestimmung

Absorptionsspektren von Polysulfidlösungen wurden von Klimmek et al. (1991) untersucht. Dabei wurde ein Differenz-Extinktionskoeffizient $\epsilon_{360-550}$ von $0,36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für Polysulfid-Schwefel (S^0) bei pH 8,5 ermittelt, bei pH 8,0 beträgt der Wert ca. $0,38 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Entsprechend wurden spektroskopische Untersuchungen während der SQR-Reaktion durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Mengen von Sulfid unter SQR-Beteiligung durch dUQ oxidiert. Es wurden einerseits Absorptionsspektren im Absorptionsbereich von Polysulfid gemessen und andererseits die Zunahme der Differenz-Absorption bei (360 minus 550) nm. Da in Anwesenheit von Thesit keine reaktionsabhängige Zunahme der Absorption im bzgl. Polysulfid interessierenden Bereich zu beobachten war, wurde Thesit bei diesen Versuchen weggelassen. Erschwert wurden diese Messungen durch die Anwesenheit des Chinons im Versuchsansatz, dessen Absorption sich bis in den Meßbereich von Polysulfid erstreckte. Da die Versuche ohne Thesit durchgeführt wurden, konnte keine konstante Chinon-Absorption beobachtet werden. Der Einfluß von Thesit auf die Absorptionseigenschaften von wässrigen Chinon-Lösungen ist in Abschnitt 5.2.1.1., S. 24f, beschrieben. Die Versuche wurden bei pH 6,5, pH 7,0 und pH 7,5 durchgeführt, wobei jeweils das gleiche Ergebnis erzielt wurde. **Abb. 5.28.** (S. 52) zeigt Absorptionmessungen bei der SQR-Reaktion bei pH 7,5 mit 40 μM dUQ und 40 μM Sulfid. Während das Spektrum reinen Polysulfids bei 360 nm eine Schulter zeigt (Klimmek et al., 1991), wurde in diesem Experiment eine Überlagerung durch eine stärker absorbierende Komponente im kürzerwelligen Bereich beobachtet (s. **Abb. 5.28. A**, S. 52). Die Zunahme im Bereich um 360 nm wurde von einer Drift überlagert, die von dUQ in Abwesenheit von Thesit verursacht wurde. Bei Abzug der Drift wurde bei sieben

Versuchen eine Absorptionzunahme bei (360 minus 550) nm von durchschnittlich $0,013 \pm 0,002$ gemessen, was bei Verwendung des Extinktionskoeffizienten von $0,38 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (bei pH 8,0) einer Menge von ca. $34 \text{ }\mu\text{M}$ Polysulfid-Schwefel (S^0) entspricht (**Abb. 5.28. B**). Diese reproduzierbare Absorptionzunahme trat stets mit einer Verzögerung auf, die im gezeigten Versuch ca. 100 s betrug. In einem Kontrollansatz wurden $40 \text{ }\mu\text{M}$ dUQ durch NaBH_4 reduziert. Abgesehen von der Drift war hier keine Zunahme der Absorption (360 minus 550) nm zu beobachten (nicht gezeigt).

A Absorptionsspektren



B Differenz-Absorptionsmessung

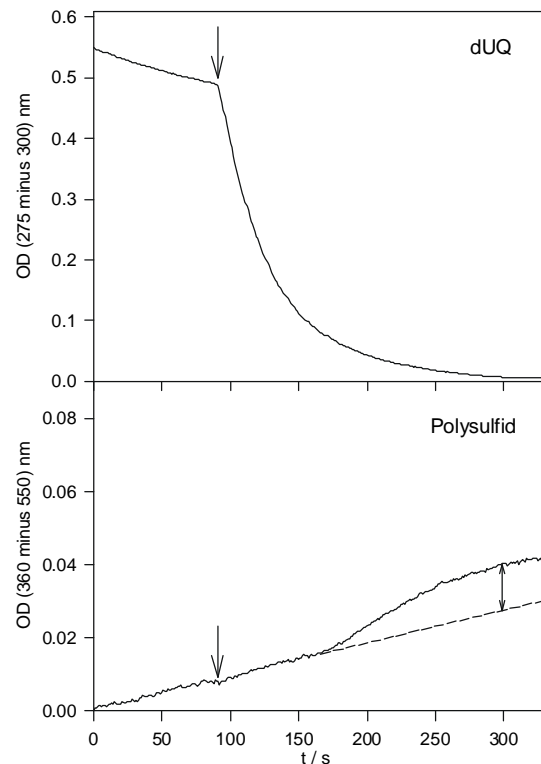


Abb. 5.28. Photometrische Bestimmung von Polysulfid. Die Messungen wurden bei pH 7,5 in Abwesenheit von Thesit durchgeführt. **A** Absorptionsspektren während der SQR-Reaktion im Absorptionbereich von Polysulfid. Der Pfeil kennzeichnet die Zunahme der Absorption im Bereich von 360 nm. **B** Differenz-Absorptionsmessung während der SQR-Reaktion. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von $40 \text{ }\mu\text{M}$ Sulfid zum Zeitpunkt $t = 92 \text{ s}$ (Pfeil). Die Reduktion von dUQ wurde mit der Differenzmessung (275 minus 300) nm verfolgt (oben), die Zunahme von Polysulfid bei (360 minus 550) nm (unten). Nach Extrapolation der Drift (gestrichelte Linie) wurde im Ablauf der SQR-Reaktion eine Zunahme der $\text{OD}_{360-550}$ von 0,013 ermittelt (Doppelpfeil).

5.4.3. Produktanalyse mit HPLC

In Zusammenarbeit mit Dr. Jörg Rethmeier und Prof. Dr. Ulrich Fischer von der Abteilung Marine Mikrobiologie der Universität Bremen wurden Analysen des Schwefelprodukts der SQR-Reaktion auf Basis von „High performance liquid chromatography“ (HPLC) durchgeführt, mit der verschiedene Schwefelspezies erfaßt werden können (Rethmeier et al., 1997, s. 8.3.8., S. 98f). Mit dieser Methode können qualitativ und quantitativ Sulfid, Elementarschwefel, Sulfit, Thiosulfat und Sulfat bestimmt werden. Die Nachweisgrenze für die verschiedenen Schwefelkomponenten liegt hierbei zwischen 1 und 5 μM . Polysulfid wird nur qualitativ erfaßt, da aufgrund der variablen Kettenlänge keine Quantifizierung möglich ist.

Die qualitative Analyse des gelblich-weißen Überzugs, der auf Zellen von *Rb. capsulatus* zu finden war, die in Gegenwart von Sulfid wachsen (vgl. Abschnitt 5.3.1.1., S. 37ff, **Abb. 5.15.**, S. 38), ergab, daß es sich hierbei um Elementarschwefel handelt, was in Einklang mit den Ergebnissen von Hansen und Van Gernerden (1972) steht. Weiterhin wurde die Analyse mit *in vitro*-Reaktionsansätzen durchgeführt, die neben Sulfid und Chinon nur gereinigte SQR enthielten. Aus einem SQR-Reaktionsansatz bei pH 6,5, der 200 μM dUQ und 200 μM Sulfid enthielt, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und analysiert. Dabei konnte die Abnahme der Sulfidkonzentration im Reaktionsverlauf dokumentiert werden (**Abb. 5.29.**). Weiterhin wurden konstante Konzentrationen von Thiosulfat und Sulfit gemessen, die gewöhnlich als Verunreinigungen in Sulfidlösungen vorliegen (J. Rethmeier, persönliche Mitteilung). Während kein Elementarschwefel und kein Sulfat detektiert werden konnten, wurde im Reaktionsverlauf eine intermediäre Zunahme der Polysulfidkonzentration gemessen. Eine Quantifizierung von Polysulfid war nicht möglich, da bei der Detektion nach der HPLC die Fluoreszenz der Monobrombiman-Gruppe erfaßt wurde, die nach der Derivatisierungsreaktion an Sulfhydrylgruppen gebunden vorliegt (s. 8.3.8., S. 98f). Hierbei trägt jedes Polysulfidmolekül unabhängig von der Anzahl der Schwefelatome in der Kette 2 Markierungen an den Enden der Schwefelkette.

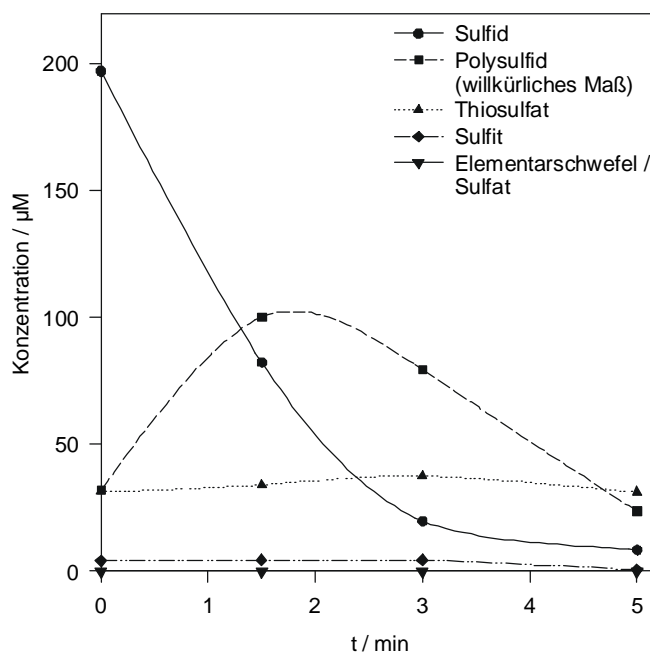


Abb. 5.29. Analyse des Schwefelprodukts mit HPLC.

Im Zeitverlauf der SQR-Reaktion bei pH 6,5 mit 200 μM Sulfid und 200 μM dUQ wurden Proben entnommen und analysiert. Während die Konzentrationen von Sulfid, Thiosulfat, Sulfit, Elementarschwefel und Sulfat durch Vergleich mit Standards ermittelt werden konnten, war die Quantifizierung von Polysulfid nicht möglich. Deshalb sind die Werte für Polysulfid nur untereinander, nicht aber mit den anderen Schwefelspezies vergleichbar.

5.4.4. Einsatz von Na_2^{35}S als Substrat

Um das Schicksal des bei der SQR-Reaktion oxidierten Sulfids besser verfolgen zu können, wurde radioaktives Sulfid als Substrat für die gereinigte SQR eingesetzt. Nach Ablauf der SQR-Reaktion wurde dann einerseits überprüft, ob proteingebundene Radioaktivität nachzuweisen war, was als Hinweis auf einen Mechanismus gedeutet werden sollte, bei dem während der SQR-Reaktion Polysulfid als wachsende Schwefelkette kovalent am Protein gebunden vorliegt. Andererseits wurde versucht, durch Extraktion mit Chloroform Elementarschwefel nachzuweisen. H_2S hat einen pK-Wert für die Dissoziation des ersten Protons von ca. 7,0 und ist flüchtig. Um die Gefährdung für den Experimentator durch flüchtiges H_2^{35}S zu verringern, wurde der Versuch bei pH 8,0 durchgeführt, bei dem die SQR noch ca. 38 % ihrer maximalen Aktivität aufweist (s. **Abb. 5.7.**, S. 29). Die Reaktivität des Na_2^{35}S wurde photometrisch durch SQR-abhängige Chinon-Reduktion überprüft.

Zum Nachweis der kovalenten Bindung von Schwefelketten an die SQR wurden folgende Ansätze mit jeweils 100 μl Gesamtvolumen vorgelegt:

250 mM Tris/HCl, pH 8,0

22 μg SQR (450 pmol bzgl. Proteinmenge) / 22 μg BSA / kein Protein

0 / 0,5 / 5 nmol dUQ

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Na_2^{35}S in Mengen von 216 pmol bis 2 nmol (2 - 18 kBq) gestartet. Nach einer Reaktionszeit von 1 min wurde ein Aliquot von 5 μl für die Radioaktivitätsmessung im Szintillationszähler aus dem Ansatz entnommen, der Rest wurde auf eine Sephadex Molekularsiebsäule (s. 8.3.9., S. 99) aufgetragen. Nach Abtrennung der niedermolekularen Substanzen wurden 50 μl für die Messung im Szintillationszähler und 20 μl für die Analyse durch Autoradiographie abgenommen. Die Messung im Szintillationszähler ergab exemplarisch für eine Versuchsserie das in **Tab. 5.4.** (S. 55) dargestellte Ergebnis, die Ergebnisse anderer Versuchsserien führten zu vergleichbaren Resultaten. Es zeigte sich, daß der Anteil der Radioaktivität im Durchlauf bei allen Ansätzen zwischen 3 und 5 % der eingesetzten Menge lag, d.h. in allen Fällen befand sich nur ein kleiner Teil der Radioaktivität in der Proteinfraction, eine spezifische Zunahme nach SQR-Reaktion war nicht meßbar.

Tab. 5.4. Proteingebundene Radioaktivität nach SQR-Reaktion bei pH 8,0. Die Stoffmenge der SQR errechnet sich aus der Proteinmenge ungeachtet des FAD-Gehalts. Es wurde jeweils der Anteil der Radioaktivität im Durchlauf der Molekularsiebsäule am Gesamtansatz angegeben.

Ansatz	Protein	Protein		dUQ	Na ₂ ³⁵ S		Radioaktivität im Durchlauf
		(µg)	(pmol)	(pmol)	(kBq)	(pmol)	(%)
1	SQR	22	450	5000	2	216	3,7
2	SQR	22	450	5000	3,6	400	3,7
3	SQR	22	450	5000	7,2	800	4,9
4	SQR	22	450	5000	18	2000	5,0
5	SQR	22	450	0	18	2000	4,4
6	SQR	22	450	500	18	2000	3,2
7	-	-	-	5000	18	2000	3,3
8	BSA	22	330	5000	18	2000	4,1

Zur Analyse durch Autoradiographie wurden die Proben nach der Molekularsiebsäule in SDS-Probenpuffer ohne Mercaptoethanol aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert. Nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung wurde proteingebundene Radioaktivität durch Autoradiographie nachgewiesen (**Abb. 5.30.**). Hierbei zeigte sich Radioaktivität in allen Fällen an den Stellen, an denen sich die Proteinbande befand, d.h. unabhängig von der SQR-Reaktion wurde radioaktives Sulfid an Protein gebunden, auch an BSA. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten also keinen Hinweis auf eine während der SQR-Reaktion kovalent an der SQR wachsende Schwefelkette, sondern nur unspezifische kovalente Bindung von Sulfid an Protein.

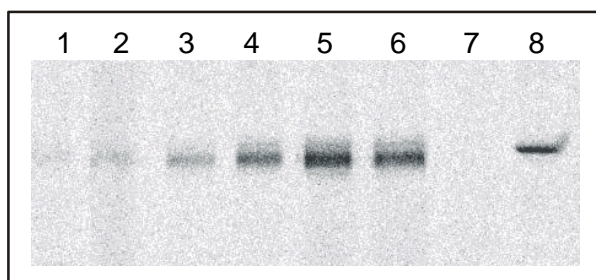


Abb. 5.30. Autoradiographie nach SQR-Reaktion bei pH 8,0 mit Na₂³⁵S. Zur Numerierung der Ansätze: s. **Tab. 5.4.**

Um festzustellen, ob unter den Bedingungen des SQR-Aktivitätstests Elementarschwefel als Produkt auftritt, wurden Reaktionsansätze, die radioaktives Sulfid enthielten, mit Chloroform extrahiert. Elementarschwefel würde sich aufgrund seiner Hydrophobizität dabei in der Chloroformphase befinden. Die Ansätze für dieses Experiment enthielten im Gesamtvolumen von 500 µl:

250 mM Tris/HCl, pH 8,0

22 µg SQR (450 pmol bzgl. Proteinmenge) / 22 µg BSA / kein Protein

0 / 0,5 / 1 / 5 nmol dUQ

Zum Reaktionsstart wurden 2 nmol Na_2^{35}S zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 1 min wurden 50 μl zur Szintillationsmessung entnommen, der Rest wurde einer Chloroformextraktion mit 500 μl Chloroform unterzogen. Nach Trennung der Phasen wurde das Chloroform durch Abdampfen entfernt, und beide Phasen wurden durch Szintillationsmessung untersucht. Die Tatsache, daß auch nach SQR-Reaktion der Anteil der Radioaktivität in der Chloroformphase nur maximal 1,3 % betrug, wurde als Beleg dafür gewertet, daß unter den vorgegebenen Bedingungen der SQR-Reaktion kein Elementarschwefel bei der Oxidation von Sulfid gebildet wurde, sondern vielmehr hydrophile Polysulfidketten (**Tab. 5.5.**).

Tab. 5.5. Chloroformextrahierbare Radioaktivität nach SQR-Reaktion bei pH 8,0 mit Na_2^{35}S . Die Stoffmenge der SQR errechnet sich aus der Proteinmenge ungeachtet des FAD-Gehalts. Es wurde jeweils der Anteil der Radioaktivität in der Chloroformphase am Gesamtansatz angegeben.

Ansatz		Protein		dUQ	Na_2^{35}S		Radioaktivität in Chloroformextrakt
		(μg)	(μmol)	(μmol)	(kBq)	(μmol)	(%)
1	SQR	22	450	5000	18	2000	0,6
2	SQR	22	450	1000	18	2000	1,1
3	SQR	22	450	500	18	2000	1,2
4	SQR	22	450	0	18	2000	1,3
5	-	-	-	5000	18	2000	0,2
6	BSA	22	330	5000	18	2000	0,5

6. Diskussion

Biologische Oxidation von Sulfid ist bei Mikroorganismen weit verbreitet und wurde auch für einige Eukaryoten nachgewiesen. Während die Beteiligung des mechanistisch und strukturell gut untersuchten Flavocytochrom c (FCC) an der Sulfid-Oxidation immer mehr fraglich erscheint, wurde in den letzten Jahren die Sulfid-Chinon Reduktase (SQR) bei einer Reihe von Bakterien als das für diese Reaktion verantwortliche Enzym identifiziert. Die Bedeutung der SQR wird durch die Verbreitung bei phylogenetisch entfernten Gruppen innerhalb der Bakterien unterstrichen (Griesbeck et al., 2000). Trotzdem lagen bisher keine Daten über den Mechanismus dieses Enzyms vor. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren vorgestellt, mit dessen Hilfe es möglich wurde, auf einfache Weise größere Mengen dieses Enzyms heterolog zu exprimieren und zu reinigen. Somit standen zum ersten Mal ausreichende Mengen dieses Enzyms zur Verfügung, um eine eingehende physikochemische Charakterisierung und Studien zum katalytischen Mechanismus der Enzymreaktion mit Hilfe von gerichteter Mutagenese und Produktanalyse durchzuführen. Die Ergebnisse lassen nun erste Rückschlüsse auf an der Reaktion beteiligte Aminosäuren und einen katalytischen Mechanismus zu.

6.1. Heterologe Expression und Reinigung der SQR aus *Rb. capsulatus*

Die erste Klonierung und heterologe Expression einer SQR wurde mit der SQR von *Rb. capsulatus* durchgeführt (Schütz et al., 1997). Dabei zeigte sich, daß auch *E. coli* die SQR als peripheres Membranprotein exprimiert. Die Reinigung des exprimierten Proteins erfolgte in der gleichen Weise wie bei der Isolierung aus dem ursprünglichen Organismus *Rb. capsulatus* durch eine Anionentauscher- und eine Molekularsiebsäule. Obwohl durch diese Prozedur aktives Enzym mit einer sogar erhöhten spezifischen Aktivität gewonnen werden konnte, wurde durch die Ionentauschersäule immer ein Teil des Enzyms inaktiviert, außerdem blieb die Ausbeute gering (Schütz, 1997; M. Schütz, persönliche Mitteilung).

Eine Vereinfachung der Reinigungsprozedur sollte durch die Verwendung einer C-terminalen Histidin-Markierung erreicht werden. Der C-Terminus wurde deshalb ausgewählt, weil durch eine N-terminale Modifikation eine Störung der dort gelegenen Flavin-Bindedomäne zu befürchten war. Das mit einer Markierung aus 10 Histidinen modifizierte Enzym zeigt zwar im Vergleich zum nativen Protein nur geringfügig veränderte Eigenschaften wie eine minimale Erhöhung des K_M -Werts für Sulfid und Chinon von jeweils 2 μM auf 4 μM bzw. 3 μM , eine Reinigung mit Hilfe des His-Tags war jedoch unter keiner der getesteten Bedingungen möglich, da das Protein keinerlei Wechselwirkung mit einer Nickel-NTA-Säule zeigte (Schütz, 1997; Griesbeck, 1998). Die Verwendung einer Ionentauscher- und einer Molekularsiebsäule führte zwar zu gereinigtem Protein, aber unter den oben erwähnten Einschränkungen, was den His-Tag obsolet werden ließ. Da eine Reinigung der modifizierten SQR im denaturierten Zustand mit einer Nickelsäule in einem Schritt möglich war (Griesbeck, 1998), wurde angenommen, daß die mangelnde Zugänglichkeit des His-Tags im gefalteten Zustand des Proteins möglicherweise auf die Dimerisierung zurückzuführen war, die für die SQR aufgrund von Experimenten mit Gelfiltration, Ultrafiltration (Schütz et al., 1997) und Nativgel (Schödl, 2000) angenommen wird. Fast alle Flavoproteine der Disulfid-Oxidoreduktase-

Familie liegen als Homodimer vor, wobei die Untereinheiten durch eine C-terminale Interface-Domäne verbunden sind (Mathews, 1991). Wenn auch die Dimerisierung der SQR durch den C-Terminus bewerkstelligt wird, könnte der His-Tag auf diese Weise seine exponierte Stellung verlieren.

Daher wurde trotz der Nähe des N-Terminus zur ersten Flavin-Bindedomäne nun doch die N-terminale Modifizierung der SQR vorgenommen. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Reinigung mit Hilfe eines N-terminalen His-Tags konnte die geforderten Ansprüche erfüllen. Die Vereinfachung der Prozedur auf einen Reinigungsschritt mit einer Nickelsäule führte zur Vermeidung der inaktivierenden Schritte mit der Molekularsieb- und der Ionentauschersäule, so daß gereinigtes, aktives Protein in einer Ausbeute von 3 - 5 mg Protein aus 1 l *E. coli*-Kultur gewonnen werden konnte. Bei der Expression in *E. coli* wurde allerdings der größte Teil in Inclusion Bodies gefunden, was möglicherweise auf die Natur der SQR als membranassoziiertes Protein zurückzuführen ist. Hier konnte durch Absenken der Temperatur der membrangebundene Anteil erhöht werden. Daß die Membranbindung in *E. coli* ebenso wie in *Rb. capsulatus* peripherer Natur ist, zeigte sich durch die Solubilisierbarkeit mit NaBr, standardmäßig wurde jedoch mit Thesit oder Dodecylmaltosid solubiliert, da die Stabilität des gereinigten Proteins in Gegenwart von Detergenz größer war. Während die Halbwertszeit der SQR-Aktivität bei Aufbewahrung im Dunkeln in Gegenwart von Detergenz ca. 10,2 Tage betrug (s. **Abb. 5.11.**, S. 33), verringerte sich die Halbwertszeit ohne Detergenz auf ca. 6 Tage (nicht gezeigt). Eine Abspaltung des His-Tags an der eingefügten Spaltstelle durch die Protease Enterokinase konnte nicht erreicht werden. Die für die Erkennung benötigten Aminosäuren scheinen durch die Faltung des Proteins auch während der Bindung des Proteins an eine Nickelsäule nicht zugänglich zu sein. Die Eigenschaften des modifizierten Proteins zeigten aber weitgehend Übereinstimmung mit denen des nativen Proteins (Schütz et al., 1997), so daß auf eine Abspaltung verzichtet werden konnte. Daneben könnte die aus fünf Aminosäuren bestehende Erkennungssequenz auch als eine Art Abstandhalter für die exponierte Stellung des His-Tags sorgen und deshalb möglicherweise die Bindung des His-Tags an die Nickelsäule sicherstellen.

6.2. Eigenschaften der heterolog exprimierten SQR aus *Rb. capsulatus*

6.2.1. Spezifische Aktivität

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde die Meßmethodik einer Überprüfung unterzogen. Dabei wurde einerseits der Differenz-Extinktionskoeffizient von dUQ in wässriger Lösung ermittelt, und zum anderen wurde die Eichung des verwendeten Spektrophotometers überprüft. Der Differenz-Extinktionskoeffizient für dUQ in wässriger Lösung wurde mit $\epsilon_{275-300} = 12,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt (s. 5.2.1.1., S. 24f), während bis dahin ein Wert von $15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ angenommen wurde, der aber für dUQ in Ethanol bei 275 nm bestimmt ist (Morton, 1965). Diese Änderung in der Berechnung ist mit einer Zunahme um den Faktor 1,2 verbunden. Zum anderen wurden die Messungen der vorliegenden Arbeit mit einem Diodenarray-Spektrophotometer vorgenommen, während alle Messungen davor mit einem Doppelwellenlängenphotometer (Aminco DW-2) durchgeführt worden waren. Ein direkter Vergleich der Geräte und die Eichung durch ein unabhängiges, weiteres

Spektrophotometer ergaben eine fehlerhafte Eichung des Doppelwellenlängenphotometers um den Faktor 1,8. Der Wechsel in der Meßmethodik ist also insgesamt für eine Erhöhung der Meßwerte um den Faktor 2,2 verantwortlich. Deshalb sind die spezifischen Aktivitäten der nativen SQR aus *Rb. capsulatus* und der C-terminal modifizierten SQR nicht direkt mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnissen vergleichbar, sondern müssen mit dem Faktor 2,2 korrigiert werden.

Die mit einem N-terminalen His-Tag versehene SQR wies mit 50 - 55 U/mg bei frisch isolierten Präparationen eine deutlich höhere spezifische Aktivität auf als die aus *Rb. capsulatus* gereinigte native SQR mit 7,7 U/mg (nach Korrektur) (Schütz, 1997) und die in *E. coli* exprimierte native oder mit einem C-terminalen His-Tag versehene SQR mit 22 - 33 U/mg (korrigiert) (ebd.). Da die Verwendung einer Molekularsiebsäule zu einer partiellen Inaktivierung des Enzyms geführt hatte (ebd.), war mit der Umgehung eines solchen Schrittes und der Vereinfachung der gesamten Reinigungsprozedur auch eine Erhöhung der spezifischen Aktivität aufgrund schonenderer Präparationsbedingungen zu erwarten. Aus dem Ergebnis kann gefolgert werden, daß der N-terminale His-Tag die Umsatzrate nicht wesentlich negativ zu beeinflussen scheint.

6.2.2. Substrataffinität

Während die native SQR einen K_M -Wert von jeweils 2 μM für beide Substrate aufgewiesen hatte, zeigte die C-terminal modifizierte SQR eine geringfügige Verringerung der Affinität für Sulfid mit einem K_M von 4 μM und für Ubichinon mit einem K_M von 3 μM (Schütz, 1997). Der gleiche Effekt zeigte sich bei Verwendung eines N-terminalen His-Tags. Auch hier war die Affinität für beide Substrate geringfügig herabgesetzt. Für Sulfid wurde ein K_M von 5 μM bestimmt, für dUQ ein K_M von 3 μM (s. 5.2.2., S. 25). Diese Änderungen können im Rahmen der Meßgenauigkeit vernachlässigt werden. Damit kann ein entscheidender Einfluß des His-Tags auf die Bindestellen für beide Substrate ausgeschlossen werden, d.h. Ergebnisse von Untersuchungen zum Mechanismus können vom modifizierten Enzym auf das native Enzym übertragen werden, sofern sie die Wechselwirkung der SQR mit den Substraten betreffen.

6.2.3. Die prosthetische Gruppe FAD

Die Beteiligung eines Flavins als prosthetische Gruppe in der SQR-Reaktion war aus den Fluoreszenzanregungs- und -emissionsspektren des isolierten Enzyms (Arieli et al., 1994) sowie aus der Sequenzhomologie zu Flavoproteinen der Glutathion Reduktase-Familie abgeleitet worden (Schütz et al., 1997). In Bezug auf die Bindung des Flavins können Flavoproteine in zwei Klassen eingeteilt werden. In einer Klasse ist das Flavin nicht-kovalent an das Protein gebunden. Trotz des nicht-kovalenten Charakters ist die Bindung meist sehr stark mit Bindungskonstanten im nanomolaren Bereich, so daß man bzgl. des Flavins eher von einer prosthetischen Gruppe als von einem Cofaktor spricht (Müller und Van Berkel, 1991). Demgegenüber ist das Flavin in der zweiten Klasse an der C(8)-Methylgruppe kovalent an einen Cystein- oder Histidinrest des Proteins gebunden (Massey und Hemmerich, 1980). Vertreter dieser zweiten Klasse sind neben Flavocytochrom c (FCC) auch die Succinat-Dehydrogenase und die Fumarat-Reduktase (Chen et al., 1994). In der Flavoproteinuntereinheit von FCC, die das Protein mit der größten Homologie im

Vergleich zur SQR darstellt, ist das FAD kovalent an Cystein72 gebunden. Ein Sequenzvergleich zwischen SQR und FCC zeigte, daß das entsprechende Cystein in der SQR nicht vorhanden ist, was eine nicht-kovalente Bindung in der SQR wahrscheinlich macht. Zudem wurde bereits gezeigt, daß bei Rückfaltung denaturierter SQR in Gegenwart von FAD aktives Enzym erhalten werden konnte, was eine kovalente Bindung von FAD unwahrscheinlich werden läßt (Griesbeck, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde die nicht-kovalente Natur der FAD-Bindung durch Extraktion des Flavins aus dem Holoenzym (Müller und Van Berkel, 1991) bestätigt. Hierbei wurde das Protein in Gegenwart von Kaliumbromid oder Schwefelsäure denaturiert, so daß das gebundene Flavin entlassen wurde. Qualitative Bestimmung als FAD und quantitative Bestimmung wurden sowohl enzymatisch mit Hilfe des D-Aminosäure-Oxidase-Apoproteins als auch fluorimetrisch durchgeführt. Während Flavoproteine normalerweise ein Flavinmolekül pro Proteinuntereinheit enthalten, zeigte die quantitative Bestimmung bei verschiedenen SQR-Präparationen nur FAD-Gehalte zwischen 5 und 25 % bezogen auf das SQR-Monomer (s. 5.2.3., S. 26). Da das Flavin für die katalytische Aktivität essentiell ist, dürfte es sich hier um einen nicht-physiologischen Zustand handeln. Obwohl mit zwei verschiedenen Extraktionsmethoden und zwei verschiedenen quantitativen Bestimmungsmethoden jeweils die gleichen Ergebnisse bzgl. des FAD-Gehalts ermittelt wurden, konnte eine Korrelation zwischen Flavingehalt, spezifischer Aktivität und Fluoreszenzintensität aus unbekanntem Gründen nicht gefunden werden. Deshalb wurde die spezifische Aktivität auch weiterhin bezogen auf die Proteinmenge angegeben und nicht durch den FAD-Gehalt korrigiert, bei Fluoreszenzmessungen konnte die Intensität zwischen verschiedenen Präparationen oder zwischen Wildtyp und mutierten Enzymen nicht verglichen werden.

Zwei Gründe sind für die mangelhafte FAD-Besetzung aufzuführen. Zum einen könnte der Einbau von FAD während der Expression in *E. coli* durch die mangelnde Fähigkeit von *E. coli* zur FAD-Biosynthese limitiert sein. Diese Limitierung sollte durch Zugabe von FMN, das wegen der fehlenden Ladung besser als FAD von *E. coli* aufgenommen werden kann (N. Nelson, persönliche Mitteilung), ins Wachstumsmedium umgangen werden. Hierbei wurde jedoch keine Erhöhung des FAD-Gehalts in aus *E. coli* isolierter SQR festgestellt. Ein weiterer praktikabler Weg zur Erhöhung des FAD-Gehalts könnte die Expression unter einem weniger starken Promotor als dem der T7-Polymerase in *E. coli* sein. Hierbei müßte zusätzlich durch eine Absenkung der Temperatur die Überexpression so verlangsamt sein, daß die FAD-Biosynthese von *E. coli* eine gleichbleibende Versorgung mit FAD gewährleisten könnte. Darüberhinaus könnte die N-terminal modifizierte SQR auch im ursprünglichen Organismus *Rb. capsulatus* überexprimiert werden. Dazu müßte das modifizierte Gen auf einem Plasmid unter der Kontrolle des ursprünglichen Promotors vorliegen. Da das in *Rb. capsulatus* verwendete konjugative Plasmid pPHU233 in ca. zehnfacher Kopienzahl vorliegt, wie Messungen zur spezifischen Aktivität der SQR in isolierten Membranen einerseits des Wildtyps und andererseits in Gegenwart des SQR-enthaltenden Plasmids zeigen (Schütz et al., 1999), sollte diese moderate Überexpression die Fähigkeit von *Rb. capsulatus*, ausreichende Mengen an FAD zu synthetisieren, nicht überfordern. Der zweite Grund für die mangelhafte FAD-Besetzung könnte ein Verlust von FAD während der Reinigung mit der Ni-NTA-Säule sein, was auch für das Chromophor Phytochromobilin bei der Reinigung des cyanobakteriellen Phytochroms nachgewiesen ist (Mozley et al., 1997; W. Gärtner, persönliche Mitteilung). Deshalb wurde in die

Puffer während der Ni-NTA-Reinigung FAD gegeben, was eine Erhöhung des FAD-Gehalts bis auf 50 % zur Folge hatte. Möglicherweise kann eine Kombination beider Strategien zu einer nahezu vollständigen Besetzung führen.

6.2.4. Fluoreszenzeigenschaften

Die Fluoreszenzeigenschaften der His-Tag-SQR erwiesen sich als beinahe identisch zu denen der nativen SQR (Schütz 1997) mit Anregungsmaxima bei 280, 375 und 470 nm und einem Emissionsmaximum bei 520 nm (s. 5.2.4., S. 26f). Allerdings zeigte sich der Anregungspeak bei 280 nm im Vergleich zu den anderen Maxima als niedriger. Während bei der nativen SQR das Verhältnis der Maxima 280 nm : 375 nm : 470 nm 3 : 1 : 1,2 betrug, erwies sich das Verhältnis bei den Messungen der modifizierten SQR als 1 : 1,25 : 1,75. Die Anregungsmaxima bei 375 und um 450 nm entsprechen den Absorptionsbanden von Flavin und sind damit auf die Eigenfluoreszenz des Flavins zurückzuführen. Dagegen entspricht der Anregungspeak bei 280 nm der Absorptionsbande der aromatischen Aminosäuren, so daß es sich bei der Fluoreszenz von Flavoproteinen in diesem Bereich zumindest teilweise um eine Übertragung der Anregungsenergie vom Protein auf die Flavinuntereinheit handelt (Munro und Noble, 1999). Deshalb könnte eine Veränderung des Fluoreszenzverhaltens in diesem Bereich auf eine Änderung der Proteinumgebung des Flavins in der modifizierten SQR zurückzuführen sein. Genauere Aussagen, z.B. über das Quenchverhalten aromatischer Aminosäuren in der Flavinumgebung, lassen sich aber erst bei Kenntnis der Fluoreszenzquantenausbeute beider SQR-Formen treffen, die aber aufgrund des geringen Flavinbesetzungsgrads der isolierten SQR zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bestimmt werden konnte (s. Abschnitt 6.2.3., S. 59ff). In der ersten Flavin-Bindedomäne, an die die N-terminale Modifikation angrenzt, findet sich eine aromatische Aminosäure. Dieses Tyrosin (Tyr18 in der SQR und Tyr50 in FCC) ist im für die SQR vorgeschlagenen Strukturmodell (s. Abschnitt 6.3., S. 67ff) ca. 20 Å vom Isoalloxazinring des Flavins entfernt, was zumindest einen Energietransfer nach Förster (Häder, 1999) nicht ausschließt. Durch die Anwesenheit des His-Tags könnte beispielsweise die Konformation der SQR solchermaßen verändert sein, daß der Abstand dieses Tyrosins zum Flavin und damit die Effizienz der Energieübertragung verändert werden. Gleiches könnte auch für andere aromatische Aminosäuren in der Polypeptidkette gelten.

6.2.5. Isoelektrischer Punkt und pH-Abhängigkeit der Reaktion

Der isoelektrische Punkt wurde für das modifizierte SQR-Protein mit 6,2 bestimmt (s. 5.2.5., S. 27f). Dieser Wert lag um 0,7 pH-Einheiten niedriger als der theoretisch ermittelte Wert von 6,9. Da die SQR N-terminal mit sechs Histidinen, vier Lysinen und einem Aspartat modifiziert wurde, ist ein Einfluß dieser geladenen Aminosäuren auf den ermittelten IEP sehr wahrscheinlich, zumal zumindest der His-Tag in exponierter Stellung vorliegt. Der theoretische Einfluß der N-terminalen Modifikation beträgt 0,8 pH-Einheiten. Damit könnte der IEP der nativen SQR im Bereich von 7,0 liegen.

Dagegen war der meßbare Einfluß der zusätzlichen Aminosäuren auf die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Reaktion eher gering (s. 5.2.6., S. 28f). Für die native SQR wurde ein pH-Optimum

von 6,3 ermittelt, wobei die halbmaximale Aktivität bei pH 5,5 bzw. 8,0 lag (Schütz, 1997). Daneben wurde für die SQR mit 10 Histidinen am C-Terminus ein geringfügig verändertes pH-Optimum im Bereich von pH 6,5 bis 6,7 gemessen, wobei der Aktivitätsbereich etwas kleiner war mit halbmaximaler Aktivität bei pH 6,2 und pH 8,0 (s. **Abb. 5.7.**, S. 29; Griesbeck, 1998). In ähnlicher Weise war das Optimum der N-terminal modifizierten SQR geringfügig in basische Richtung zu pH 6,7 verschoben. Der Aktivitätsbereich war zum Säuren hin allerdings deutlich breiter mit 50 %-Grenzen bei pH 4,5 und 8, wobei sich im Säuren ein lokales Minimum bei pH 5,5 neben einem zweiten kleineren Maximum bei pH 5,0 zeigte (s. **Abb. 5.7.**, S. 29). Dieses zweite Aktivitätsmaximum, das auch bei der C-terminal modifizierten SQR zu beobachten war, könnte durch einen Wechsel des Reaktionsmechanismus verursacht werden, bei dem im Neutralen eine Protonierung eines Reaktionsintermediats durch eine Aminosäure im aktiven Zentrum stattfindet, während im Säuren Protonen aus der Umgebung diese Reaktion begünstigen. Eine ausführliche Diskussion dieses Teils des Reaktionsmechanismus findet sich in Abschnitt 6.4.3. (S. 79ff). Daß die Aktivität im basischen Bereich relativ schnell abfällt, während im Säuren ein breiterer Aktivitätsbereich zu beobachten ist, wurde bereits von Schütz (1997) in Zusammenhang mit einer Präferenz für das Substrat H_2S über HS^- gebracht, da Sulfid einen pK-Wert von 7,0 für das erste Proton aufweist (Steudel, 1996b).

6.2.6. Temperaturabhängigkeit und Stabilität

Sulfidabhängige Reduktion von Chinon wurde in Gegenwart und Abwesenheit von SQR beobachtet. Dabei war die unkatalysierte Reaktion erst oberhalb von 45°C nachweisbar, während in Gegenwart von SQR bereits ab 5°C ein signifikanter Umsatz erfolgte. Die Auswertung der Temperaturabhängigkeit der beiden Reaktionen mit Hilfe eines Arrhenius-Plots ergab eine Herabsetzung der Aktivierungsenergie durch die SQR von ca. 114 kJ/mol auf 25 kJ/mol (Mederer, 2000), was einer Beschleunigung der Reaktion um den Faktor $4 \cdot 10^{15}$ entspricht. Üblicherweise beschleunigen Enzyme chemische Reaktionen um das 10^8 - bis 10^{20} -fache im Vergleich zur spontanen Reaktion (Madigan et al., 2001). Damit ist die SQR ein vergleichsweise effektiver Katalysator.

Der maximale Umsatz in Gegenwart von SQR erfolgte bei 45°C, darüberhinaus nahm die Aktivität aufgrund der Denaturierung des Proteins ab (s. 5.2.8.1., S. 31), d.h. bis zu dieser Temperatur scheint die Konformation des Enzyms über eine Versuchsdauer von 10 min nicht zerstört zu werden. Dieses Ergebnis stand auch in Einklang mit der Messung der Sekundärstruktur in Abhängigkeit von der Temperatur. Bis ca. 45°C war keine Abnahme der Elliptizität meßbar, bis ca. 60°C zeigte sich nur ein geringer Verlust der nativen Sekundärstruktur, und erst oberhalb von 60°C nahm die Elliptizität deutlich bis zum vollkommenen Verlust der nativen Sekundärstruktur ab (s. 5.2.8.2., S. 32). Stabilität über einen Zeitraum von 1 h wurde in einem weiteren Versuchsansatz gemessen. Hier zeigte sich, daß allein bei 30°C kein Aktivitätsverlust festzustellen war, bei 35°C betrug die Aktivität nur noch 60 % des Anfangswerts (s. 5.2.8.2., S. 32). Da das Temperaturoptimum des Wachstums von *Rb. capsulatus* 33°C beträgt (Hansen und Van Gemerden, 1972), scheint auch die SQR für diesen Temperaturbereich optimiert zu sein. Anhand der vorliegenden Ergebnisse wären nach 1 h bei 33°C noch ca. 85 % der SQR in aktiver Form

vorhanden, was einer Halbwertszeit von 4,3 h entspräche. Allerdings muß man davon ausgehen, daß die Stabilität eines Enzyms in der physiologischen Umgebung deutlich größer ist als in isolierter Form, insbesondere bei einem Membranprotein, so daß diese Ergebnisse mehr theoretischer Natur sind. Andererseits ist *Rb. capsulatus* ein Organismus, der sich schnell auf wechselnde Umweltbedingungen einstellen kann (Weaver et al., 1975), wozu ein schneller Umsatz der beteiligten Enzyme beitragen würde.

Eine Optimierung auf eine deutlich höhere Umgebungstemperatur scheint für die SQR von *Aquifex aeolicus* erfolgt zu sein. Dieser hyperthermophile, chemotrophe Organismus zeigt optimales Wachstum bei 85°C (Deckert et al., 1998), und die SQR-Aktivität nahm bis 70°C deutlich zu - aus technischen Gründen konnten keine Aktivitätsmessungen über 70 °C durchgeführt werden - , was ein Optimum im Bereich der optimalen Wachstumstemperatur erwarten läßt (Nübel et al., 2000). Die Sequenzidentität der Enzyme aus *Rb. capsulatus* und *A. aeolicus*, die sehr unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten aufweisen, beträgt 38 % (s. Abschnitt 4.2.2.2., S. 15ff). Ein Vergleich der thermostabilen SQR mit den 6 bekannten SQR-Sequenzen mesophiler Organismen zeigt, daß alle als SQR-Fingerprint betrachteten Bereiche auch bei der *A. aeolicus*-SQR vorhanden sind. Für die erhöhte Stabilität von Proteinen extremophiler Organismen werden im allgemeinen vermehrte ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen und eine dichtere Packung der Proteinstruktur verantwortlich gemacht, allgemein gültige Regeln lassen sich aber nicht aufstellen (Jaenicke und Böhm, 1998). Darüberhinaus lassen sich die erwähnten Modifikationen kaum an der Primärstruktur ablesen. Tatsächlich finden sich in der SQR-Sequenz von *A. aeolicus* in einigen Bereichen einige geladene Aminosäuren mehr als bei den mesophilen SQR-Sequenzen. Beispielsweise gibt es für die beiden Doppellysin-Motive in der *A. aeolicus*-SQR an den Positionen 94/95 und 134/135 keine Entsprechung in mesophilen SQRs. Im Strukturmodell der SQR, das auf der Kristallstruktur der Flavoproteinuntereinheit von FCC basiert (s. Abschnitt 6.3., S. 67ff) und das hier auch als Modell für die *A. aeolicus*-SQR dienen soll, wurden die Abstände der den beiden Doppellysin-Motive entsprechenden Bereiche zu sauren Aminosäuren bestimmt, die ebenfalls nur in der *A. aeolicus*-SQR vorkommen. Bei diesen Aminosäuren handelt es sich um einen Aspartatrest in Position 208 und Glutamatreste in den Positionen 118, 131, 258, 368, 404 und 408. Der Abstand betrug in allen Fällen mindestens 18 Å, so daß keine ionischen Wechselwirkungen zwischen einem der Doppellysin-Motive und einer der genannten sauren Aminosäuren vorhergesagt werden können. Somit scheint die Thermostabilität der *A. aeolicus*-SQR nicht auf Wechselwirkungen der genannten basischen und sauren Aminosäurereste zu beruhen, möglicherweise gibt aber auch das Strukturmodell die tatsächliche Struktur der SQR nur unzureichend wieder.

Der Einfluß von Licht als weiterer Parameter für die Stabilität der SQR wurde systematisch über längere Zeiträume beobachtet. Dabei zeigte im Dunkeln aufbewahrte SQR mit einer Halbwertszeit von 10,2 Tagen deutlich höhere Stabilität als SQR bei konstanter Beleuchtung mit einer 60 W-Glühbirne, bei der die Halbwertszeit auf 1,7 Tage reduziert war (s. 5.2.8.3., S. 32f). Diese Beobachtung ist im Hinblick auf die prosthetische Gruppe FAD nicht überraschend. Da Flavine an verschiedenen lichtabhängigen Prozessen wie der lichtabhängigen Reparatur von DNA oder dem Phototropismus beteiligt sind (Massey, 2000), werden die spektroskopischen und photochemischen

Eigenschaften von Flavin bereits sehr lange untersucht (Heelis, 1991). Oxidiertes Flavin wird bei Belichtung in den angeregten Singulett-Zustand angehoben und kann durch Intersystem Crossing in den Triplett-Zustand übergehen. Das im angeregten Triplett-Zustand befindliche Flavin ist eine sehr reaktive Spezies, die intra- und intermolekular Photoreduktionen, Photoadditionen und Photodealkylierungen durchführen kann. Die Wirkung dieses photodynamischen Effekts wurde im Hinblick auf Proteine, Nukleinsäuren, verschiedene andere organische Moleküle und auch auf ganze Zellen untersucht. Im Fall der Photoreduktion abstrahiert das angeregte Flavin ein Wasserstoffatom aus seiner eigenen Ribityl-Seitenkette oder aus der Umgebung. Das dabei entstehende Semichinon kann zu Flavin und Dihydroflavin disproportionieren oder unter aeroben Bedingungen durch Sauerstoff reoxidiert werden, wobei reaktiver Singulett-Sauerstoff entsteht. Dieser kann mit Aminosäureresten in der Umgebung des Flavins reagieren - untersucht wurde dieser Fall für aromatische Aminosäuren sowie Cystein, Methionin und Lysin - und einen Verlust der enzymatischen Aktivität nach sich ziehen (McCormick, 1977). Abgesehen von den direkten Wirkungen des angeregten Flavins, die unter dem Begriff Typ I-Reaktionen zusammengefaßt sind, ist daher der Effekt der Abnahme der Enzymaktivität auch auf die Wirkung des Singulett-Sauerstoffs zurückzuführen. Diese Reaktionen werden als Typ II-Reaktionen bezeichnet (Heelis, 1991). Wie die Messungen zur lichtabhängigen Stabilität der SQR zeigen, ist die beschriebene Selbstzerstörung eines Flavoproteins bei Belichtung auch in der SQR zu beobachten. Als Konsequenz daraus empfiehlt es sich, isolierte SQR-Präparationen wie auch jedes andere Flavoprotein lichtgeschützt und anaerob aufzubewahren.

6.2.7. Redoxeigenschaften der SQR

Die SQR katalysiert eine Redoxreaktion zwischen Sulfid und Chinon. Das Mittelpunktspotential der Oxidation von Sulfid zu Elementarschwefel liegt bei -270 mV. Wenn Disulfid das Produkt der Oxidation darstellt, liegt ein Potential von -200 mV vor (Brune, 1989). Andererseits weist das Redoxpaar UQ / UQH₂ ein Potential von +120 mV auf (Thauer et al., 1977). Da die SQR die Elektronenübertragung zwischen den beiden Redoxpaaren vermittelt, war für das Flavin in der SQR ein Mittelpunktspotential zwischen -200 und +120 mV zu erwarten gewesen. Tatsächlich wurde aber das Redoxpotential des Flavins mit +186 mV bei pH 7,0 bestimmt, um 66 mV positiver als das des Elektronenakzeptors. Dieses Ergebnis ist noch überraschender im Hinblick auf den üblicherweise von Flavoproteinen abgedeckten Redoxbereich. Freies FAD weist ein Mittelpunktspotential von -219 mV auf, freies FMN von -205 mV (ebd.). Aufgrund der Proteinumgebung kann allerdings das Potential von Flavoproteinen in einem weiten Bereich von ca. 600 mV variieren. Extreme Beispiele sind einerseits Flavodoxin mit einem Potential von -495 mV für das Redoxpaar FIH[•] / FIH⁻ (Ghisla und Massey, 1989) und andererseits das Electron-Transfer Flavoprotein (ETF) aus *Methylophilus methylotrophus* mit einem Potential von +196 mV für das Redoxpaar FI_{ox}[•] / FI⁻ (Byron et al., 1989). Eines der positivsten Potentiale für die 2 e⁻ - Übertragung bei Flavoproteinen weist die Flavoprotein-Untereinheit des Flavocytochroms *c* von *Chlorobium thiosulfatophilum* mit + 28 mV auf (Meyer et al., 1991). Die SQR befindet sich somit am äußersten, positiven Ende des von Flavoproteinen überstrichenen Bereichs. Wenig überraschend dagegen war die Beobachtung, daß es sich bei der SQR um einen 2 e⁻ -Übergang handelt und keine

Semichinon-Absorptionsbanden zu beobachten sind. Denn sowohl der Elektronendonator Sulfid als auch der Elektronenakzeptor Chinon sind $2 e^-$ -Überträger, so daß in mechanistischer Hinsicht keine Stabilisierung des Semichinons zu erwarten war. Das Redoxverhalten der SQR wäre hier vergleichbar mit dem der NAD(P)H:Chinon-Reduktase (DT-Diaphorase), einem Flavoprotein mit einem Mittelpunktspotential von -159 mV bei pH 7,0, das den Elektronentransfer von NAD(P)H auf Chinon katalysiert und ausschließlich 2 Elektronen als Hydrid überträgt (Tedeschi et al., 1995; Li et al., 1995). Auch in dieser Hinsicht stellen sich Flavoproteine als sehr flexibel dar, da sie sowohl $1 e^-$ - als auch $2 e^-$ - Überträger sein können (Ghisla und Massey, 1989; Stankovich, 1991).

Dieses enorme Spektrum verschiedener Redox Eigenschaften von Flavoproteinen wird durch eine unterschiedliche Proteinumgebung verwirklicht. Der Einfluß der Protein-Flavin-Wechselwirkung auf die Redox Eigenschaften des Flavins wurde bereits eingehend untersucht (Ghisla und Massey, 1989; Niemz und Rotello, 1999). Während positive Ladungen in der Flavinumgebung die negative Ladung des reduzierten Flavins stabilisieren können und somit das Mittelpunktspotential in positive Richtung verschieben, wird das Potential durch negative Ladungen oder eine hydrophobe Umgebung nahe dem Flavin negativer. Zugleich kann auch eine Stabilisierung des neutralen Semichinons erfolgen. Da oftmals auch Carbonyl- und Aminogruppen des Proteinerückgrats an diesen Wechselwirkungen beteiligt sind, sind diese Effekte durch gerichtete Mutation meist nur schwer nachzuweisen. In Untersuchungen der Wechselwirkung von Flavin mit anderen organischen Molekülen konnte gezeigt werden, daß bereits eine einzelne Wasserstoffbrückenbindung das Redoxpotential von Flavin um 80 mV verschieben kann (Cuello et al., 2000).

Im Vergleich zur menschlichen Glutathion Reduktase, die ein Mittelpunktspotential von -227 mV aufweist (Williams Jr., 1992), und zu FCC aus *Allochromatium vinosum* mit einem Redoxpotential von -26 mV (Meyer et al., 1991) zeigt die SQR aus *Rb. capsulatus* das weitaus positivste Potential mit +186 mV. Aus diesem Grund sind bei der SQR mehr positive Ladungen in der Umgebung des Flavins zu erwarten als bei den beiden anderen Enzymen, was sich, wie oben ausgeführt, nicht notwendigerweise in der Aminosäuresequenz widerspiegeln muß. Möglicherweise beeinflusst aber auch die N-terminale Modifikation des Proteins aus sechs Histidinen, vier Aspartatresten und einem Lysin die Redox Eigenschaften des Flavins, da die erste Flavin-bindende Domäne bereits mit der zweiten Aminosäure am N-Terminus beginnt. Dies sollte durch Messungen an einer nicht oder andersartig modifizierten SQR überprüft werden. Weiterhin könnte das ungewöhnlich hohe Redoxpotential auch durch die nicht-physiologische Umgebung des Enzyms während der Messung verursacht sein, so daß die SQR als peripheres Membranprotein möglicherweise in Membranumgebung aufgrund von Konformationsänderungen oder der Hydrophobizität der Membran ein anderes Mittelpunktspotential aufweist. Ein solcher Einfluß könnte durch die Anwesenheit von Vesikeln aus Membranlipiden während der Bestimmung des Redoxpotentials überprüft werden.

Der Grund für das außergewöhnlich positive Redoxpotential der SQR könnte die Beschränkung der sulfidabhängigen Chinonreduktion auf bestimmte Stoffwechselzustände sein. Die Expression der SQR wird in *Rb. capsulatus* nicht nur durch das Substrat Sulfid induziert. In Anwesenheit des terminalen Elektronenakzeptors Sauerstoff findet eine deutliche Verstärkung der SQR-Expression

statt (Griesbeck et al., 2000; Bathe, 2001). Als Grund für diese Expressionskontrolle wurde postuliert, daß die SQR nur dann exprimiert wird und in der Folge Elektronen von Sulfid in den Chinonpool einspeisen kann, wenn zugleich ein Elektronenakzeptor wie Sauerstoff vorhanden ist, der für die Reoxidation des Chinonpools sorgt (Griesbeck et al., 2000). Bei einer Überreduktion des Chinonpools würden der cyclische Elektronentransport und damit die ATP-Synthese und die NAD⁺-Reduktion zum Erliegen kommen (Ferguson et al., 1987; McEwan, 1994). Diese Überreduktion des Chinonpools könnte auch durch das ungewöhnlich hohe Redoxpotential der SQR verhindert werden. Das Mittelpunktspotential der SQR ist um mehr als 60 mV positiver als das ihres Oxidanten UQ. Das aktuelle Potential wird aber auch durch das Konzentrationsverhältnis des jeweiligen Redoxpaares bestimmt, wie aus der Nernst-Gleichung für ein Redoxpaar bezogen auf die Standard-Wasserstoffelektrode bei pH 7,0 ersichtlich ist:

$$E' = E_0' + \frac{RT}{nF} \ln \frac{UQ}{UQH_2}$$

E': aktuelles Potential (V)

E₀': Mittelpunktspotential (V)

R: allgemeine Gaskonstante (8,3145 J K⁻¹ mol⁻¹)

T: Temperatur (K)

n: Zahl der Elektronen

F: Faraday-Konstante (96494 J V⁻¹ mol⁻¹)

Ein Konzentrationsverhältnis für das Redoxpaar UQ : UQH₂ von 10 : 1 führt beispielsweise zu einer Erhöhung des aktuellen Potentials um 59 mV verglichen mit E₀' (bei 24°C). Die SQR kann damit nur dann Elektronen in den Chinonpool einspeisen, wenn das Verhältnis UQ : UQH₂ überwiegend auf der Seite des oxidierten UQ liegt. Damit wird eine Überreduktion des Chinonpools durch Sulfid verhindert. Diese zusätzliche Limitation der sulfidabhängigen Chinonreduktion, die die gleiche Funktion erfüllen würde wie die Sauerstoff-modulierte Expressionskontrolle, wäre v.a. unter wechselnden Ernährungsbedingungen, wie sie für *Rb. capsulatus* beschrieben sind (Weaver et al., 1975), sinnvoll, wenn beispielsweise die Anwesenheit von Sulfid und Sauerstoff die Expression der SQR induziert hat, aber die SQR aufgrund ihrer Lebensdauer (die Halbwertszeit könnte *in vivo* mehr als 4,3 h betragen (s. Abschnitt 6.2.6., S. 62ff), wenn kein regulierter proteolytischer Abbau vorliegt) auch dann noch funktionell vorhanden ist, wenn die Sauerstoffkonzentration bereits wieder abgenommen hat.

Darüberhinaus könnte das Redoxpotential der SQR auch allosterisch reguliert sein, z.B. durch die Substrate Sulfid und Chinon. Die Regulation eines Enzyms durch das Redoxpotential wurde für die Succinat-Dehydrogenase nachgewiesen, die in freier Form ein Mittelpunktspotential von 0 mV aufweist (Stankovich, 1991). Bindung des Produkts Oxalacetat an eine regulatorische Stelle des Enzyms führt zu einer Verschiebung des Potentials um 200 mV in negative Richtung, so daß die Succinat-Dehydrogenase nicht mehr von ihrem Substrat Succinat reduziert werden kann, das ein Potential von +30 mV hat. Dagegen führt die Bindung des Substrats Succinat an die regulatorische Stelle zu einer Verschiebung der Potentiale des Flavins und des Eisen-Schwefel-Zentrums in positive Richtung. Somit wird dieses Enzym bei Anwesenheit von Substrat oder Produkt durch die Veränderung der Redox Eigenschaften an- bzw. abgeschaltet. Möglicherweise wird auch das Mittelpunktspotential der SQR allosterisch reguliert und weist unter physiologischen Bedingungen

ein anderes Redoxpotential auf. Dies könnte durch Redoxtitration in Gegenwart potentieller regulatorischer Faktoren wie z.B. UQ ermittelt werden.

6.3. CD-Spektroskopie und Struktur der SQR

Die Familie der Disulfid-Oxidoreduktasen bildet innerhalb der Flavoproteine nicht nur funktionell und mechanistisch eine Gruppe aufgrund der redoxaktiven Disulfidgruppe nahe dem FAD, sondern auch aufgrund der Struktur. Obwohl die Sequenzidentität der Vertreter dieser Familie im Vergleich zur Glutathion Reduktase (GR), dem Prototypen dieser Familie, meist nur gering ist (von 34 % bis unter 20 %), beträgt die räumliche Äquivalenz zwischen 36 und 80 % (Mathews, 1991; Van Driessche et al., 1996). Dabei ist i.A. ein Aufbau aus vier Domänen eingehalten, von denen die erste und zweite Domäne FAD bzw. das Nicotinamid-Nukleotid binden. Während Domäne 3 als zentrale Domäne bezeichnet wird, bildet die vierte Domäne als sog. „Interface-Domäne“ einen Teil des aktiven Zentrums der jeweils anderen Untereinheit (Mathews, 1991; Williams Jr., 1992). Die SQR wird aufgrund ihrer Sequenzhomologie auch zur Glutathion Reduktase-Familie gerechnet. Darüberhinaus zeigt sie drei konservierte Cysteinreste, von denen zwei an identischen Positionen liegen wie eine redoxaktive Disulfidbrücke in FCC. Weiterhin wird auch für die SQR eine homodimere Organisation angenommen (Schütz et al., 1997), wobei die Verbindung der beiden Untereinheiten ebenfalls am C-Terminus stattfinden könnte, was auch aufgrund von Versuchen mit einem C-terminalen His-Tag vermutet wurde (Griesbeck, 1998). Die Sequenzidentität der SQR zu GR und FCC beträgt 21 bzw. 23 %, die strukturelle Äquivalenz könnte allerdings, wie auch bei anderen Vertretern dieser Familie, deutlich größer sein. Versuche zur Kristallisation der SQR führten bisher zu keiner reproduzierbaren Kristallbildung (C. Griesbeck, unveröffentlicht), so daß die Kristallstruktur bislang nicht zugänglich ist.

Die aus dem CD-Spektrum errechneten Sekundärstrukturanteile der SQR entsprechen mit Ausnahme des etwas geringeren Helixanteils beinahe vollständig den Daten der GR, die ebenfalls durch Auswertung des CD-Spektrums der GR und aus der Kristallstruktur gewonnen wurden (s. **Tab. 5.1.**, S. 30). Darüberhinaus wurde eine Sekundärstrukturvorhersage für die SQR durchgeführt und in einem Alignment mit den aus der Kristallstruktur bekannten Sekundärstrukturelementen von FCC und GR verglichen (s. **Abb. 6.1.**, S. 68). Hier zeigte sich, daß auch die Lage der für die SQR vorhergesagten α -Helices und β -Faltblätter in vielen Bereichen mit den Positionen dieser Sekundärstrukturen in FCC und GR übereinstimmt.

	I		
SQR	-MAHIVVLGAGLGGAIMAYELREQVRKEDKVTVITKDPMYHFVPSNPWVAVG-----	51	
FCC	AGRKVVVVGGGTGGATAAKYIKLADP-SLEVTLIEPNTDYTCYLSNEVIGG-----	81	
GR	ASYDYLVVIGGGSGGLASARRAAELG---ARAAVVESHKLGGTCVNVGCVPKKVMWNTAVHSEF	78	
SQR	-----WRDRKEITVDLAPIMARKNIDFIIVAAKRLHPAENRV	88	
FCC	-----DRKLESIKHGYDG-LRAHGIQVVDHSATGIDPDKKLV	117	
GR	MHDHADYGFPSCEGKFNWRVIKEKRDAYVSRNLAIYQNN-LTKSHIEIIRGHAAFTSDPKPTI	140	
	II	-----1-----	--
SQR	ELENGQSVSYDQIVIAATGPELAFDEIEGFGP---EGHTQSIICHIDHAEAAGAAFDRFCENPGP	148	
FCC	KTAGCAEFGYDRCVVAPGIELIYDKIEGYSSEAAAALPHAWKAGEQTALRKOLEDMADGGTV	180	
GR	EV-SGKKYTAPHILIAATGMPSTPHESQI-----PGASLGITSDGFFQLEE--LPGRS	190	
	-----2-----	-----3-----	
SQR	IIIGAAQGASCFCGPAYEFTFILDALRKRKIRDKVP-MTFVTSEP---YVGHGLDGVGDTK	206	
FCC	VIAPPAAPFRCPGPGYERASQVAYYLKAHKPKSKVIILDSSQTFSS---KQSQFSKG---WE	235	
GR	VIVGA-----GYIAVEMAGILSALG-----SKTSLMIRHDKVLRSFDSMISTNCT---EE	237	
SQR	GLLEGNLRDKHIKWMTS--TRIKRVEP-GK-MVVEEVTEDGTVKPE--KELP-FGYAMMLPAF	262	
FCC	RLYGFGTENAMIEWHPGPDSAVVKVDG-GE--MMVETAFG-----DEFK-ADVINLIPPQ	286	
GR	LENAG-----VEVLKF---SQVKEVKKTLGLEVSMVTAVPGRLPVMTMIPDVCLLWAIGR	291	
	III	_III	
SQR	RG----IKALMGIEGLVNPR-GFVIVDQHQQNPTFKNVFAVGVCAIAPPVGPFPVPCGVPKTG	320	
FCC	RA----GKIAQIA-GLTNDAGWCPVDIKTFESISIHKGIVHIGDACIANP-----MPKSG	335	
GR	VPNTKDLSLNKLG-IQTDDKGHIIVDE-FQNT-NVKGIIYAVGIVCGK-----ALLT	339	
	_-----4-----	-----5-----	
SQR	FMIESMVTATAHNIGRIVRGLEPDEVGSWNAVCLADFGDKGIAFVAQPQIPP-RNV-----	375	
FCC	YSANSQGVAAAAVVALLKGE-EPGTPSYLNTCYSILAPAYGISVAAIYRPNADGS-----	390	
GR	PVAIAAGRKLAHRLF--YKE-DSKLDYNNIPTVVFSSH--PIIGTVGLTEDEAIHKYGIENVK	397	
	-----6-----		
SQR	-----NWSSQGWVHWAKEGFERFYFMHKLRRGTSETFYEKAA	412	
FCC	-----AIESVPDSSGGVTPVDAPDWVLEREVQYAYS-WYNNIV	426	
GR	TYSTSFTPMYHAVTKRRTKCVMMKVCANKEKVVGIHMOGLGCDEMLQGFVAVKM-GATKAD	459	
SQR	MKLLGIDKLVKAVKKG	427	
FCC	HDTFG	431	
GR	FDNTVAIHPTSSEELVTLR	478	

Abb. 6.1. Alignment von SQR, FCC und GR mit Sekundärstrukturelementen. α -Helix-Elemente sind grün unterlegt, β -Faltblätter rot. Die Sequenz der SQR von *Rb. capsulatus* ist von Schütz et al. (1999). Die Sekundärstrukturvorhersage für die SQR wurde mit dem Programm PHDsec 1.96 (Rost und Sander, 1993; <http://cubic.bioc.columbia.edu>) erstellt. Die Sequenzen und Verteilungen der Sekundärstrukturelemente von FCC und GR sind von Van Driessche et al. (1996). Bei der Nummerierung von FCC ist die Präsequenz (30 Aminosäuren) beinhaltet. Die FAD-bindenden Domänen sind mit durchgezogenen Linien und römischen Ziffern gekennzeichnet, die SQR-typischen Bereiche sind gestrichelten Linien und arabischen Ziffern.

Diese Daten berechtigen also insgesamt zu der Annahme, daß auch die Tertiärstruktur der SQR die für die Mitglieder der Disulfid-Oxidoreduktase-Familie typische Einteilung in vier Domänen aufweist und die räumliche Äquivalenz zwischen SQR und GR ebenfalls im Bereich um 36 % liegt wie die Äquivalenz zwischen FCC und GR. Auf dieser Basis wurde versucht, ein Strukturmodell der SQR mit Hilfe der bekannten Strukturen von FCC und GR zu erstellen, um Aussagen über die

räumliche Lage funktionell bedeutsamer Aminosäuren treffen zu können. Allerdings konnte das Programm SYBYL 6.7. aufgrund der geringen Sequenzidentität zwischen den Proteinen kein konsistentes Strukturmodell errechnen, da für die Berechnung eine Sequenzidentität von mindestens 25 - 30 % erforderlich ist. Deshalb wurde die Struktur einer Flavoprotein-Untereinheit von FCC als vorläufiges Strukturmodell für die SQR verwendet. **Abb. 6.2.** zeigt die Struktur, bei der diejenigen Aminosäuren explizit dargestellt sind, die in dem in Abschnitt 6.4. (S. 71ff) vorgeschlagenen Mechanismus eine Rolle spielen. Dabei wurden die Aminosäuren von FCC durch die homologen Aminosäuren der SQR ersetzt, sofern sie nicht identisch waren. Die betreffenden Aminosäuren sind in **Tab. 6.1.** aufgeführt:

Tab. 6.1. Im Strukturmodell (Abb. 6.2., S. 70) gezeigte Aminosäuren von FCC und die homologen Aminosäuren in der SQR.

Aminosäure in FCC	Aminosäure in SQR
Lysin159	Cystein127
Glutamin163	Histidin131
Cystein191	Cystein159
Glutamat197	Glutamat165
Glutamin229	Histidin196
Aspartat324	Valin300
Cystein367	Cystein353

Das in **Abb. 6.2.** (S. 70) dargestellte Modell zeigt die Positionen der an dem vorgeschlagenen Mechanismus in Abschnitt 6.4. (S. 71ff) beteiligten Aminosäuren in Relation zu FAD. Im folgenden soll die Lage dieser Aminosäuren im Hinblick auf ihre möglichen Funktionen kurz diskutiert werden. Das redoxaktive Disulfid wird von den beiden Cysteinresten Cys159 und Cys353 gebildet, die zueinander einen Abstand von 2,1 Å aufweisen. Der Abstand zum C(4a)-Atom des Isoalloxazinrings beträgt für Cys159 3,3 Å und für Cys353 4,6 Å, so daß eher Cys159 als Wechselwirkungspartner für den Charge Transfer-Komplex und das kovalente Addukt mit FAD in Frage kommt. Diese Abstände sind vergleichbar mit denen im aktiven Zentrum der GR von *E. coli*. Dort sind die beiden Cysteinreste Cys42 und Cys47 3,2 bzw. 6,3 Å vom C(4a)-Atom des Isoalloxazinrings entfernt. Das dritte konservierte Cystein (Cys127) ist mit einem Abstand von ca. 13 Å im vorliegenden Modell zu weit von den anderen beiden Cysteinresten entfernt, als daß es eine Disulfidbrücke mit Cys159 oder Cys353 bilden könnte. Als Base im aktiven Zentrum wird Glu165 vorgeschlagen, das zu den Cysteinresten des redoxaktiven Disulfids Cys159 und Cys353 Abstände von 6,5 bzw 8,0 Å aufweist. Dieser Abstand ist etwas größer als der Abstand der Base His439 im aktiven Zentrum der GR von *E. coli* zu den beiden Cysteinen Cys42 und Cys47, der 3,6 bzw. 4,5 Å beträgt. Dennoch könnte das deprotonierte Glu165 die Base im aktiven Zentrum der SQR darstellen, durch die an einem Cysteinrest ein Thiolat-Ion erzeugt wird. Val300, dessen entsprechende Aminosäure in FCC, Asp324, mit der Ribityl-Seitenkette von FAD wechselwirkt, liegt ebenfalls in der Nähe des aktiven Zentrums, es ist allerdings näher an der Ribityl-Seitenkette als am Isoalloxazinring des FAD positioniert. Von den drei essentiellen Cysteinresten ist Val300 9 - 10 Å entfernt. Die durch die Mutation Val300Asp verursachte drastische Verringerung der Affinität für Sulfid dürfte somit durch

eine zusätzliche negative Ladung in der Nähe der Bindestelle des ebenfalls negativ geladenen Substrats HS^- , die sich im vorgeschlagenen Modell an einem der Cysteine befindet, verursacht sein. Die beiden untersuchten konservierten Histidine liegen nicht in unmittelbarer Umgebung des Isoalloxazinrings. His131 weist einen Abstand von ca. 15 Å zum C(5)-Atom des Isoalloxazinrings auf, His196 eine Entfernung von 18 Å zum N(1)-Atom. Beide Aminosäuren sind damit zu weit entfernt, um in der Nähe des Flavins an Protonierungsreaktionen beteiligt zu sein, wie es im in Abschnitt 6.4.3. (S. 79ff) vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus erforderlich ist. Insgesamt kann das Modell also nicht für alle Aminosäuren, die in den postulierten Reaktionsmechanismen in den Abschnitten 6.4.2. (S. 74ff) und 6.4.3. (S. 79ff) eine Rolle spielen, Positionen aufzeigen, die den geforderten Funktionen dieser Aminosäuren gerecht werden. Wahrscheinlich weicht die tatsächliche Struktur der SQR in den genannten Punkten von dem gezeigten Modell ab, zumal FCC keine Chinon-Bindestelle aufweist, sondern mit Cytochrom *c* wechselwirkt. Ebenso dürften die Bereiche der SQR, die für eine periphere Bindung des Proteins an die Cytoplasmamembran verantwortlich sind, von dem Modell nur unzureichend wiedergegeben werden, da es sich bei FCC um ein lösliches Protein handelt. Gewißheit darüber kann nur die Aufklärung der Kristallstruktur der SQR geben.

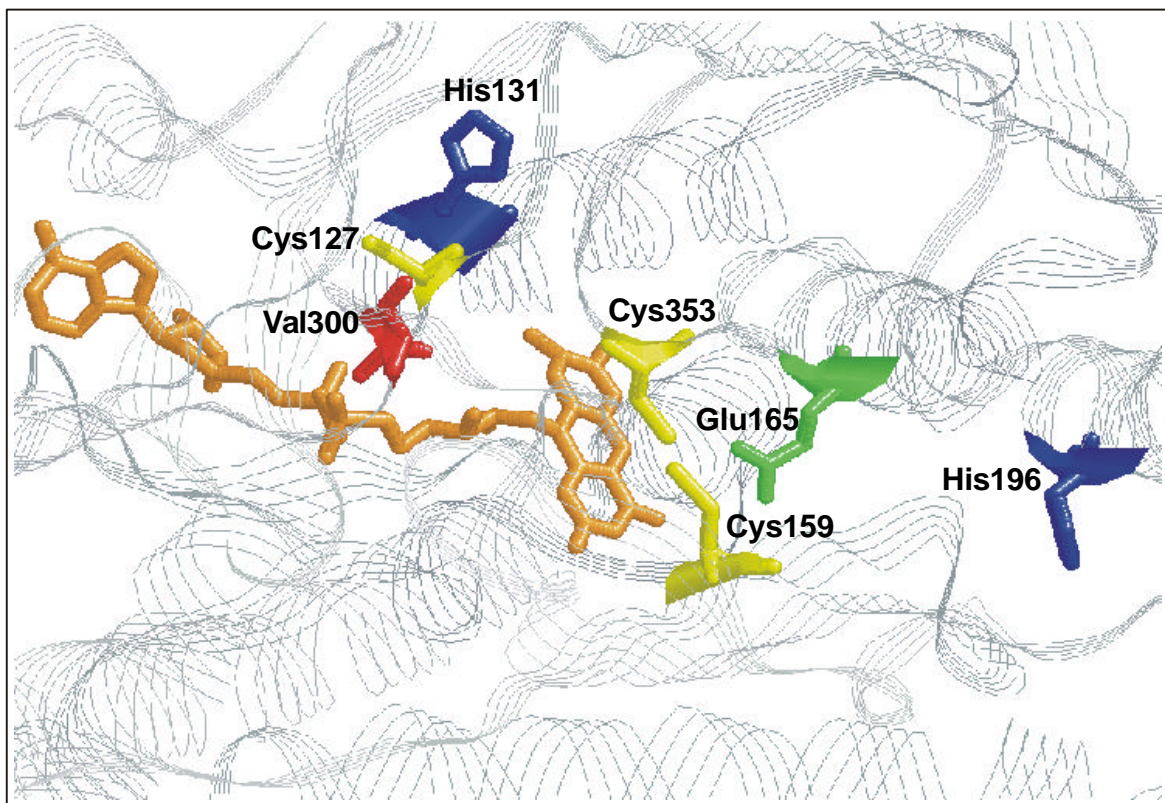
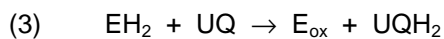
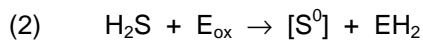


Abb. 6.2. Vorläufiges Strukturmodell der SQR. Dargestellt ist ein Teil der Struktur einer Flavoprotein-Untereinheit von FCC aus *Allochromatium vinosum* (Chen et al., 1994). Bei den explizit gezeigten Aminosäuren handelt es sich um die in der vorliegenden Arbeit durch gerichtete Mutagenese untersuchten Aminosäuren der SQR (s. Abschnitt 5.3., S. 36ff); für Glu165 wird eine entscheidende Funktion in der reduktiven Halbreaktion postuliert (s. Abschnitt 6.4.2., S. 74). In der Abbildung wurden diese Aminosäuren von FCC durch die homologen Aminosäuren der SQR ersetzt, sofern sie nicht identisch waren.

6.4. Mechanismus der SQR-Reaktion

Flavoproteine der Disulfid-Oxidoreduktase-Familie wechseln während eines katalytischen Zyklus zwischen einem oxidierten (E_{ox}) und einem mit 2 Elektronen reduzierten Zustand (EH_2), bei dem im Fall von Glutathion Reduktase (GR), Mercuri Reduktase (MR) und Thioredoxin Reduktase (TRR) die Disulfidbrücke des aktiven Zentrums als Dithiol vorliegt und FAD oxidiert ist. Bei der Lipoamid-Dehydrogenase (LipDH) ist der EH_2 -Zustand eine Mischung aus Dithiol und oxidiertem Flavin einerseits und einem Disulfid und einem reduzierten Flavin andererseits. Der mit 4 Elektronen reduzierte EH_4 -Zustand ist katalytisch nicht relevant (Williams Jr., 1992). Der Reaktionszyklus kann in zwei Halbreaktionen aufgeteilt werden, von denen die reduktive Halbreaktion die Teilreaktion E_{ox} zu EH_2 darstellt und die oxidative die Reaktion EH_2 zu E_{ox} . Auch die sulfidabhängige Reduktion von Chinon durch die SQR (Reaktion (1)) kann als Summe von zwei Teilreaktionen betrachtet werden, von denen die erste die Reduktion der oxidierten SQR (E_{ox}) durch Sulfid (Reaktion (2)) und die zweite die Reoxidation der reduzierten SQR (EH_2) durch UQ (Reaktion (3)) darstellt.



In der vorliegenden Arbeit werden Reaktion (2) als reduktive Halbreaktion und Reaktion (3) als oxidative Halbreaktion der SQR-Reaktion bezeichnet.

Da das Schicksal des Schwefelprodukts für das Verständnis der reduktiven Halbreaktion entscheidend ist, wird im folgenden zuerst das Schwefelprodukt der SQR-Reaktion diskutiert, danach die reduktive Halbreaktion und zuletzt die oxidative Halbreaktion.

6.4.1. Das Schwefelprodukt der SQR-Reaktion

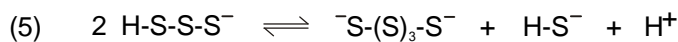
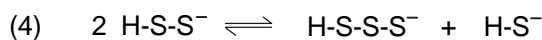
Für das Verständnis des Mechanismus der SQR-Reaktion ist es entscheidend, das primäre Produkt des oxidierten Sulfids zu kennen. Deshalb wurde versucht, das Schicksal des Sulfids in der SQR-Reaktion *in vitro* zu verfolgen. *Rb. capsulatus* oxidiert im Gegensatz zu anderen Sulfid-oxidierenden Mikroorganismen Sulfid nur bis zur Oxidationsstufe S^0 (Hansen und Van Gernerden, 1972) und scheidet Elementarschwefel als weißlich-gelben Niederschlag ab (s. **Abb. 5.15.**, S. 38). Dies wurde durch qualitative Bestimmung dieses Niederschlags mit Hilfe von HPLC bestätigt (s. 5.4.3., S. 53). Elementarer Schwefel besteht bei Raumtemperatur hauptsächlich aus S_8 -Ringen (Stedel, 1996a) und besitzt in Wasser von 25°C eine Löslichkeit von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Boulégué, 1978). Da die SQR auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran lokalisiert ist, muß das Schwefelprodukt der SQR-Reaktion in der Lage sein, aus dem Periplasma herauszudiffundieren, was im Fall von Elementarschwefel aufgrund der geringen Löslichkeit unwahrscheinlich erscheint. Eine lösliche Form von Schwefel der Oxidationsstufe S^0 stellt Polysulfid dar, das mit Elementarschwefel im Gleichgewicht steht. Deshalb erscheint es als sehr wahrscheinlich, daß es sich bei dem primären Schwefelprodukt der SQR-Reaktion um Polysulfid handelt, das sich nach Abscheidung durch die Bakterien chemisch zu Elementarschwefel umlagert. Polysulfid als Produkt

der Oxidation von Sulfid wurde bereits bei Experimenten mit *Chlorobium vibrioforme* und *Allochrocatium minutissimum* nachgewiesen (Blöthe und Fischer, 2000). Hierbei wurde gezeigt, daß bei isolierten Sphäroplasten Polysulfid als einziges Schwefelprodukt nachweisbar ist, während bei Versuchen mit ganzen Zellen neben Polysulfid auch Elementarschwefel und Thiosulfat gefunden wurden. Offenbar ist das Enzymsystem isolierter Sphäroplasten zur Bildung von Polysulfid in der Lage, was sich mit den Eigenschaften der SQR als auf der periplasmatischen Seite lokalisiertem peripheren Membranprotein deckt. Weitere Enzyme und Cofaktoren, die bei Grünen Schwefelbakterien und bei Schwefelpurpurbakterien für die weitere Oxidation u.a. zu Thiosulfat verantwortlich sind, wurden während der Sphäroplasten-Präparation offensichtlich abgetrennt. Bei *Rb. capsulatus* dagegen ist die Oxidation von Sulfid auf der Oxidationsstufe S^0 bereits beendet.

Der Nachweis der Entstehung von Polysulfid wurde mit Hilfe von verschiedenen Versuchsansätzen durchgeführt. Durch die Bestimmung der Stöchiometrie von UQ und Sulfid in der SQR-Reaktion konnte gezeigt werden, daß einerseits Sulfid nicht über die Oxidationsstufe S^0 hinaus oxidiert wird und andererseits Disulfid nicht das Endprodukt der Reaktion darstellt. Tatsächlich war die Stöchiometrie zwischen Sulfid und Chinon nahezu 1 : 1 (s. 5.4.1., S. 50f). Die exakte Auswertung der Stöchiometrie ergab, daß durch 40 μM Sulfid im Durchschnitt 36,5 μM dUQ reduziert wurden, was einer Stöchiometrie Sulfid : Chinon von 1,1 : 1 entspricht. Dieses Ergebnis spricht für eine mittlere Oxidationsstufe des Schwefelprodukts von ca. -0,2. Damit beträgt die mittlere Kettenlänge der entstandenen Polysulfidketten rein rechnerisch ca. 10 Schwefelatome. Hier muß jedoch betont werden, daß diese Genauigkeit möglicherweise die Genauigkeit der Konzentrationsbestimmung von Sulfid in der Ausgangslösung übersteigt, da beispielsweise der Eintrag geringer Mengen Sauerstoff bei der Entnahme von Sulfid bereits die Konzentration verändert. Die Verteilung verschiedener Polysulfid-Spezies in wässriger Lösung wurde von Giggenbach (1972) untersucht. Er fand bei neutralem pH hauptsächlich S_5^{2-} und S_4^{2-} . Die photometrische Bestimmung von Polysulfid im Reaktionsansatz wurde erschwert durch die gleichzeitige Reduktion von UQ, durch die eine gleichzeitige Absorptionsänderung im Meßbereich verursacht wurde. Bei Abzug der durch UQ verursachten Drift konnte mit Hilfe des Differenz-Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{360-550}$ (Klimmek et al., 1991) eine beinahe stöchiometrische Zunahme von Polysulfid-Schwefel (S^0) beobachtet werden. Während der Reduktion von 40 μM dUQ wurden hierbei ca. 34 μM Polysulfid-Schwefel (S^0) gebildet (s. 5.4.2., S. 51f). Dies entspricht ca. 42 μM Schwefelatomen bei Polysulfid der Form S_5^{2-} als Produkt. Allerdings wurde der verwendete Differenz-Extinktionskoeffizient $\epsilon_{360-550}$ bei pH 8,5 mit 0,36 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ und bei pH 8,0 mit ca. 0,38 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bestimmt (Klimmek et al., 1991), während die photometrische Polysulfidbestimmung während der SQR-Reaktion bei pH 7,5 durchgeführt wurde, so daß der ermittelte Wert der Polysulfidkonzentration nicht ganz korrekt ist. Bei allen Versuchen zur photometrischen Polysulfidbestimmung trat die Absorptionszunahme bei (360 minus 550) nm aus unbekanntem Gründen mit einer Verzögerung auf, die im in **Abb. 5.28.** (S. 52) gezeigten Versuch ca. 100 s betrug. Weiterhin zeigte die Chloroformextraktion eines Reaktionsansatzes mit Na_2^{35}S , daß nach SQR-Reaktion praktisch keine Radioaktivität in der Chloroformphase vorlag, wie es im Fall von Elementarschwefel als Reaktionsprodukt zu erwarten gewesen wäre, sondern daß die Radioaktivität auch nach der Reaktion weiterhin in der wässrigen Phase verblieb (s. Abschnitt

5.4.4., S. 54ff), was als weiterer Hinweis für die Entstehung von wasserlöslichem Polysulfid zu bewerten ist.

Während in bisherigen Modellen zum Mechanismus der SQR-Reaktion davon ausgegangen wurde, daß das Reaktionsprodukt Polysulfid als Kette am Enzym gebunden entsteht (Schütz, 1997; Griesbeck et al., 2000), wurde durch die vorliegende Arbeit klar gezeigt, daß es sich bei dem Reaktionsprodukt zwar um Polysulfid handelt, aber kein spezifisches, kovalentes Schwefelzwischenprodukt am Protein vorliegt. Durch Einsatz von Na_2^{35}S als Substrat wurde überprüft, ob unter verschiedenen Reaktionsbedingungen proteingebundene Radioaktivität nachweisbar ist. Dazu wurde nach Abtrennung der niedermolekularen löslichen Bestandteile durch eine Molekularsiebsäule die proteingebundene Radioaktivität einerseits im Szintillationszähler und andererseits durch Autoradiographie bestimmt. Die Messungen zeigten unspezifische Bindung von Sulfid an Protein, aber keine spezifische Zunahme der proteingebundenen Radioaktivität nach SQR-Reaktion (s. Abschnitt 5.4.4., S. 54ff). Dies deutet darauf hin, daß die entstehenden Polysulfidketten nicht am Protein gebildet werden, sondern daß das unmittelbare Produkt der Oxidation von Sulfid Disulfid ist. Da Polysulfidanionen verschiedener Kettenlänge in einem Gleichgewicht miteinander stehen und sich umlagern können (Giggenbach, 1972; Steudel, 1996b), ist es denkbar, daß das entstehende Disulfid selbst durch nukleophilen Angriff eines Thiolats an einem anderen Disulfidmolekül unter Freisetzung von Sulfid zu länger-kettigen Polysulfiden disproportioniert, wie es beispielhaft für die ersten Schritte durch die Gleichungen (4) und (5) gezeigt ist:



Da die SQR-Reaktion weiterhin die Sulfid-Konzentration durch Oxidation zu Disulfid vermindert, wird das Gleichgewicht der Reaktionen (4) und (5) deutlich auf die rechte Seite verschoben, so daß das Gleichgewicht von primär entstehendem Disulfid und sekundärem Trisulfid zu länger-kettigen Polysulfiden verschoben wird. Mit zunehmender Kettenlänge nimmt die Azidität der Polysulfide zu. Die entstehenden Thiolate sind dabei nukleophiler und damit reaktiver als die protonierte Form (s. **Tab. 6.2.**).

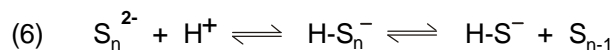
Tab. 6.2. Erste und zweite Dissoziationskonstante von H_2S_n -Molekülen (Steudel, 1996b).

H_2S_n	pK_1	pK_2
H_2S	7,0	17
H_2S_2	5,0	9,7
H_2S_3	4,2	7,5
H_2S_4	3,8	6,3
H_2S_5	3,5	5,7

Diese Verlängerung der Polysulfidketten wurde möglicherweise bei der Bestimmung des Schwefelprodukts der SQR-Reaktion durch HPLC beobachtet. Bei diesem Versuch reagiert Monobrombiman mit der Sulfhydrylgruppe verschiedener Schwefelspezies. Nach der Trennung durch HPLC werden die Substanzen anhand der Monobrombiman-Markierung detektiert. Während

bei Sulfid, Sulfit und Thiosulfat ein Monobrombiman-Molekül mit einem Molekül der jeweiligen Schwefelspezies reagiert und somit eine Quantifizierung möglich ist, reagieren im Fall von Polysulfid immer beide Enden der Kette mit Monobrombiman unabhängig von der Kettenlänge, was eine Quantifizierung unmöglich macht. Damit verursacht ein Gemisch aus kürzerkettigen Polysulfiden ein größeres Signal im Detektor als längerkettige Polysulfide. Eine anfängliche Bildung von Disulfid und kürzerkettigen Polysulfiden und die Umlagerung zu längeren Ketten könnte die anfängliche Zunahme und spätere Abnahme des Polysulfid-Signals in der HPLC im Lauf der SQR-Reaktion erklären (s. 5.4.3., S. 53). Darüberhinaus wurde, wie bereits oben erwähnt, auch photometrisch eine Zunahme der Polysulfid-Konzentration beobachtet, die bei Reduktion von 40 μM dUQ ca. 42 μM Schwefelatomen des Polysulfid-Produkts S_5^{2-} entsprach. Nicht zu erklären ist hierbei aber die Zeitverzögerung dieser Absorptionzunahme, die im gezeigten Versuch (s. **Abb. 5.28.**, S. 52) im Bereich von ca. 100 s lag. Die Umlagerung verschiedener Polysulfidspezies aufgrund der weitaus größeren Stabilität von Penta- und Tetrasulfid gegenüber Di- und Trisulfid bei neutralem pH (Giggenbach, 1972), die in den Gleichungen (4) und (5) beschrieben ist, sollte nicht im Bereich von 100 s, sondern deutlich schneller stattfinden, da die verschiedenen Polysulfidspezies nicht chromatographisch zu trennen sind (Stedel et al., 1989).

Eine Umlagerung von Polysulfid zu elementarem Schwefel unter sauren Bedingungen geschieht gemäß Gleichung (6) (Stedel, 1996b):

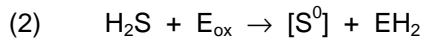


Da bei Raumtemperatur und Normaldruck die orthorhombische S_8 -Form die stabilste Form des Elementarschwefels darstellt (Stedel, 1996a), besteht der ausfallende Schwefel fast vollständig aus S_8 -Ringen. Diese Reaktion ist pH-abhängig. Das Gleichgewicht scheint im pH-Bereich zwischen 6,5 und 8, in dem die Messungen zum SQR-Produkt durchgeführt worden sind, eher auf der linken Seite zu liegen, da weder durch HPLC (s. 5.4.3., S. 53) noch durch Einsatz von Na_2^{35}S und anschließender Chloroform-Extraktion (s. 5.4.4., S. 54ff) Elementarschwefel im Reaktionsansatz nachzuweisen war. *In vivo* dürfte dagegen das Gleichgewicht dieser Reaktion deutlich auf die rechte Seite verschoben sein, da Kulturen von *Rb. capsulatus* bei Sulfid-Oxidation nachweisbar Elementarschwefel abscheiden (s. 5.4.3., S. 53), der aufgrund der geringen Löslichkeit dem Reaktionsgleichgewicht entzogen wird. Da Kulturen von *Rb. capsulatus* in Medien mit einem pH von 6,8 wachsen und Schwefel abscheiden, scheint die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts nicht durch eine Änderung des pH-Werts verursacht zu sein. Der Grund für die Verschiebung des Gleichgewichts ist bisher unbekannt.

6.4.2. Die reduktive Halbreaktion

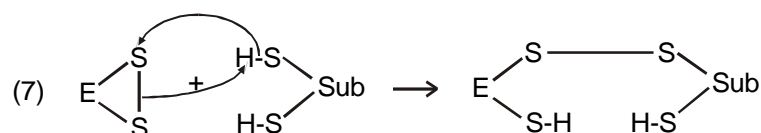
Die reduktive Halbreaktion stellt bei den Flavoproteinen der Disulfid-Oxidoreduktase-Familie die Reduktion des oxidierten Enzyms (E_{ox}) zu EH_2 dar. Die Enzyme dieser Familie katalysieren Elektronenübertragungen zwischen Schwefel- und Kohlenstoff-Zentren (Massey und Hemmerich, 1980; Williams Jr., 1992), z.B. zwischen NADPH und Glutathion (Glutathion Reduktase, GR), zwischen einem Liponsäureamid-Dithiol und NAD^+ (Lipoamid-Dehydrogenase, LipDH) oder

zwischen NADPH und Thioredoxin (Thioredoxin Reduktase, TRR). Die physiologische Richtung der Elektronenübertragung und damit die Festlegung, welche der beiden Teilreaktionen reduktiv und welche oxidativ ist, hängt von der Funktion des einzelnen Enzyms ab. Im Fall der SQR geschieht die Reduktion des Enzyms in Abhängigkeit von Sulfid (s. S. 71):

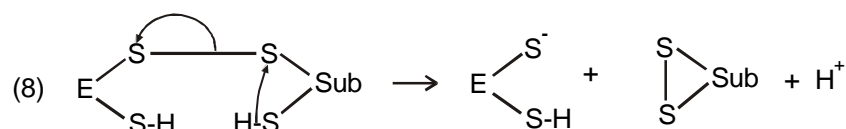


Dies entspricht auch der reduktiven Teilreaktion der LipDH, bei der das Enzym durch das Dithiol der Liponsäure reduziert wird. Im Fall von GR und TRR dagegen entspricht dies der oxidativen Teilreaktion, da das Disulfid-Substrat (Glutathion bzw. Thioredoxin) hier von EH_2 zum Dithiol reduziert wird. Die Mercuri Reduktase (MR) ist funktionell keine Disulfid-Oxidoreduktase, da hier kein Disulfid als Substrat beteiligt ist, der Mechanismus beinhaltet aber auch die Elektronenübertragung zwischen Flavin und einer Disulfidbrücke, so daß auch diese Teilreaktion mit der reduktiven Halbreaktion der SQR vergleichbar ist.

Der Mechanismus der Elektronenübertragung zwischen einem schwefelhaltigen Substrat, der redoxaktiven Disulfidbrücke im aktiven Zentrum und FAD wurde für GR, LipDH, TRR und MR eingehend untersucht. Der Elektronentransfer zwischen dem Dithiol- bzw. Disulfid-Substrat und dem Flavin erfolgt stets über ein Paar von redoxaktiven Cysteinen, die je nach Redoxzustand als Disulfid oder Dithiol vorliegen. Bei diesen Reaktionen besitzen beide Cysteine spezifische Rollen. Während ein Cystein exponierter ist und ein gemischtes Disulfid mit dem Substrat während der Reaktion bildet, ist das zweite Cystein für die Wechselwirkung mit dem Flavin verantwortlich. Dies zeigt sich u.a. bei Alkylierung der LipDH durch Iodacetamid, bei der nur eines der beiden entscheidenden Cysteine alkyliert werden kann und das alkylierte Enzym die spezifische Charge Transfer-Absorption, die durch Wechselwirkung eines Thiolats mit dem oxidierten Flavin entsteht, aufweist (Williams Jr., 1992). Dies wurde auch durch spezifische Mutagenese bestätigt. Der Austausch jedes der redoxaktiven Cysteine der LipDH gegen Serin führt zu beinahe vollständiger Inaktivierung des Enzyms (Hopkins und Williams Jr., 1995). Dagegen unterscheiden sich die beiden mutierten Enzyme v.a. dadurch, daß die Charge Transfer-Absorption von der Anwesenheit des weiter in Richtung C-Terminus gelegenen Cysteinrests abhängt. Somit besitzt jedes der beiden Cysteine eine spezifische Rolle, die vom jeweils anderen Cystein nicht wahrgenommen werden kann. Im oxidierten Zustand wird diese Disulfidbrücke des Enzyms (E) durch das Dithiol des Substrats (Sub) geöffnet. Dabei entsteht intermediär ein gemischtes Disulfid zwischen einem der Cysteine im aktiven Zentrum und einer Thiolgruppe des Substrats:



Durch nukleophilen Angriff der zweiten Thiolgruppe des Substrats wird das gemischte Disulfid wieder aufgelöst, und am Enzym bleibt ein Dithiol zurück (nach Williams Jr., 1992):



Während diese Reaktionen in der LipDH in der angegebenen Richtung stattfinden, laufen sie in der GR und der TRR in der umgekehrten Richtung ab. Das entstandene Thiolat bildet einen Charge Transfer-Komplex mit dem oxidierten Flavin, was durch eine spezifische Charge Transfer-Absorptionsbande zwischen 530 und 540 nm zu beobachten ist (ebd.). Bei der SQR wurde das Auftreten eines Charge Transfer-Komplexes spektroskopisch bisher nicht untersucht, bei ersten Ansätzen zur Kristallisation der SQR konnten aber rote Kristalle erhalten werden (C. Griesbeck, unveröffentlicht), bei denen möglicherweise der Charge Transfer-Komplex stabilisiert ist.

Die Reduktion des Flavins durch das Dithiol des Proteins erfolgt durch Bildung eines kovalenten Addukts zwischen der Thiolgruppe eines Cysteinrests und dem C(4a)-Atom des Isoalloxazinrings. Dieses Zwischenprodukt konnte beispielsweise bei der MR mit Hilfe von sequenzspezifischer Mutagenese nachgewiesen werden. Die MR besitzt zusätzlich zu dem redoxaktiven Cysteinpaar im aktiven Zentrum ein weiteres katalytisches Cysteinpaar nahe dem C-Terminus (Miller et al., 1989). Nach Austausch von drei der vier Cysteine gegen Alanin, nämlich von Cys135, Cys558 und Cys559, nicht aber von Cys140, das für das Charge Transfer-Addukt verantwortlich ist, konnte bei Zugabe von NADP⁺ das kovalente Flavin-C(4a)-Thiol-Addukt stabilisiert werden (Miller et al., 1990). Ein solches kurzlebige, kovalente Flavin-Cysteiny-Addukt wird aufgrund der spektralen Eigenschaften inzwischen auch als lichtinduziertes Intermediat bei den LOV-Domänen des pflanzlichen Blaulichtrezeptors Phototropin angenommen (Salomon et al., 2000). Die LOV-Domänen stellen Mitglieder der Superfamilie der PAS-Domänen dar. Diese sind Bestandteil vieler sensorischer und regulatorischer Proteine, die durch Umweltsignale wie Licht und Sauerstoff reguliert werden.

Neben dem redoxaktiven Cysteinpaar ist bei der reduktiven Halbreaktion noch eine Base von entscheidender katalytischer Bedeutung. Die Base abstrahiert ein Proton von einer Thiolgruppe im aktiven Zentrum, so daß ein Thiolat entsteht. Dieses Thiolat weist im Vergleich zum Thiol erhöhte Nukleophilie auf, so daß die Reaktivität zwischen den Dithiolen bzw. zwischen dem Thiol und FAD erhöht wird. Während es sich bei der GR (Pai und Schulz, 1983) und der LipDH (Hopkins und Williams Jr., 1995) um ein Histidin handelt, nimmt in der TRR ein Aspartat diese Rolle wahr (Williams Jr., 1995). Die Bedeutung dieser Basenkatalyse wurde beispielsweise durch den Austausch dieses Histidin in der LipDH gegen Glutamin gezeigt. Das resultierende Enzym wies eine Aktivität von 0,4 % verglichen mit dem nativen Enzym auf, zudem konnte keine Charge Transfer-Absorption mehr beobachtet werden (Williams Jr., 1992). Obwohl der Mechanismus von FCC noch nicht so im Detail untersucht wurde wie der anderer Mitglieder der GR-Familie, konnte bei Versuchen zur Adduktbildung zwischen Flavin und Sulfid eine Base im aktiven Zentrum identifiziert werden, die aufgrund des beobachteten pK-Werts von 6,5 für ein Histidin gehalten wurde (Meyer et al., 1991). Die Aufklärung der Struktur von FCC zeigte allerdings einen Glutamatrest (s. **Abb. 6.2.**, S. 70) an der entsprechenden Position (Chen et al., 1994).

Da innerhalb der GR-Familie die beschriebenen Mechanismen konserviert sind, könnte auch der Mechanismus der SQR nach diesem Schema ablaufen. Auch in der SQR sind Cysteinreste konserviert, und der Austausch jedes einzelnen Cysteins gegen Serin führt zu fast vollständiger Inaktivierung des Enzyms (s. 5.3.1.2., S. 39ff). Dies zeigt, daß auch hier jedes der Cysteine eine spezielle Funktion erfüllt, die von keinem der beiden anderen Cysteine übernommen werden kann.

Die Tatsache, daß die Flavin-Fluoreszenz bei keinem der mutierten Enzyme durch Sulfidzugabe vermindert werden kann, ist ein Hinweis auf die Beteiligung der Cysteine an der reduktiven Halbreaktion, wie sie oben beschrieben wurde. Zwei der Cysteine in der SQR finden sich im Vergleich zu dem redoxaktiven Disulfid in FCC an identischen Stellen in der Sequenz und sind damit gute Kandidaten für die Bildung des für den oben beschriebenen Mechanismus essentiellen redoxaktiven Disulfids. Darüberhinaus existiert in der SQR aber noch zusätzlich ein drittes entscheidendes Cystein. Möglicherweise erlaubt die Konformation des Proteins keine Wechselwirkung zwischen dem Disulfid nahe am Flavin und dem Substrat Sulfid, so daß die Funktion des dritten Cysteins die Bindung des Substrats Sulfid sein könnte. Gegen dieses konformationelle Problem spricht allerdings, daß z.B. bei der GR das Substrat Glutathion, das deutlich größer ist als Sulfid, an ein Cystein nahe am Flavin binden kann. Für Thioredoxin dagegen, ein 12 kDa-Protein, ist aufgrund seiner Größe der Zugang zum aktiven Zentrum der TRR erschwert, so daß bei der bakteriellen TRR eine deutliche Konformationsänderung mit der Bindung des Substrats einhergeht, während bei der TRR der höheren Eukaryoten ein zusätzliches peripheres Disulfid bzw. ein Selenylsulfid für die Wechselwirkung mit dem Substrat verantwortlich ist (Williams Jr., 1995; Williams Jr. et al., 2000). Ein solches Problem sollte es bei der SQR aufgrund der geringen Größe des Sulfidmoleküls nicht geben. Da für die drei Cysteine in der SQR durch die vorliegenden Versuche zwar funktionelle Bedeutung nachgewiesen werden konnte, die spezifische Rolle der einzelnen Cysteine aber nicht geklärt ist, erfolgte die Zuordnung der Cysteine in **Abb. 6.3.** (S. 78) nur auf Basis der Homologie zu FCC, so daß Cys159 und Cys353 das redoxaktive Disulfid nahe dem FAD darstellen. Bei der Base im aktiven Zentrum, die im oben beschriebenen Mechanismus für die Erhöhung der Nukleophilie des Thiols verantwortlich ist, könnte es sich um Glu165 handeln, das homolog zu der Base Glu197 im aktiven Zentrum von FCC ist. Klarheit hierüber könnte die funktionelle Charakterisierung einer an dieser Stelle spezifisch mutierten SQR bringen. Die Beteiligung eines der beiden untersuchten Histidine (His131 und His196) an dieser Funktion erscheint aufgrund der vorliegenden Daten unwahrscheinlich, da die verbleibende Aktivität der beiden spezifisch mutierten Enzyme mit 20 bzw. 38 % (s. 5.3.3., S. 45ff) deutlich höher liegt als bei der spezifisch in der Base des aktiven Zentrums mutierten LipDH (Williams Jr., 1992). Darüberhinaus legt die unvollständige Reoxidation der SQR-His131Ala die Beteiligung zumindest dieses Histidins an der oxidativen Teilreaktion nahe.

In **Abb. 6.3.** (S. 78) ist ein potentieller Mechanismus der reduktiven Halbreaktion der SQR dargestellt. Der Zusammenhang zwischen den Positionen der entscheidenden Aminosäuren und ihren vorgeschlagenen Funktionen wird in Abschnitt 6.3. (S. 67ff) ausführlich diskutiert. In diesem Mechanismus werden allen drei Cysteinresten spezifische Funktionen zugeordnet, die nicht von den jeweils anderen beiden Cysteinen übernommen werden können. Cys159 und Cys 353 bilden das redoxaktive Disulfid nahe am FAD, Cys127 ist für die Wechselwirkung mit dem Substrat Sulfid verantwortlich. Struktur (1) stellt die Ausgangsform der oxidierten SQR dar. Sie steht durch den Austausch der Disulfidbrücke im Gleichgewicht mit (2), die von einem Sulfidmolekül unter Bildung eines Persulfids an Cys127 und eines Thiols an Cys353 zu der Form (3) reduziert werden kann. Durch nukleophilen Angriff eines weiteren Sulfidmoleküls am Persulfid kann an Cys127 die ursprüngliche Thiolgruppe wiederhergestellt werden, ein Disulfidmolekül verläßt als primäres

Schwefelprodukt das Enzym. Als Base im aktiven Zentrum wirkt das deprotonierte Glu165, das ein Proton von Cys159 abstrahiert, so daß das Thiolat-Ion an Cys159 als Donor einen Charge Transfer-Komplex mit dem oxidierten Flavin bildet (4). Nach Bildung des kovalenten Thiol-Flavin-Addukts zwischen Cys159 und Flavin-C(4a) (Struktur (5)) liegen am Ende der reduktiven Halbreaktion das reduzierte Flavin und eine Disulfidbrücke zwischen Cys159 und Cys353 vor (6). Evidenz für einen solchen Mechanismus könnte wahrscheinlich durch die Beobachtung der Charge Transfer-Absorption bei dem Wildtyp-Enzym und den spezifisch mutierten SQR-Enzymen erlangt werden. U.a. sollte durch eine der Cystein-Serin-Mutationen, nämlich Cys159Ser, die Charge Transfer-Absorption beseitigt sein, während sie bei den beiden anderen Cystein-Serin-Mutationen stabilisiert sein könnte. Auf diese Weise könnte man die spezielle Funktion jedes Cysteins beleuchten. Auch die Funktion von Glu165 als Base im aktiven Zentrum könnte durch Mutation und Messung des Charge Transfer-Addukts bestätigt bzw. widerlegt werden.

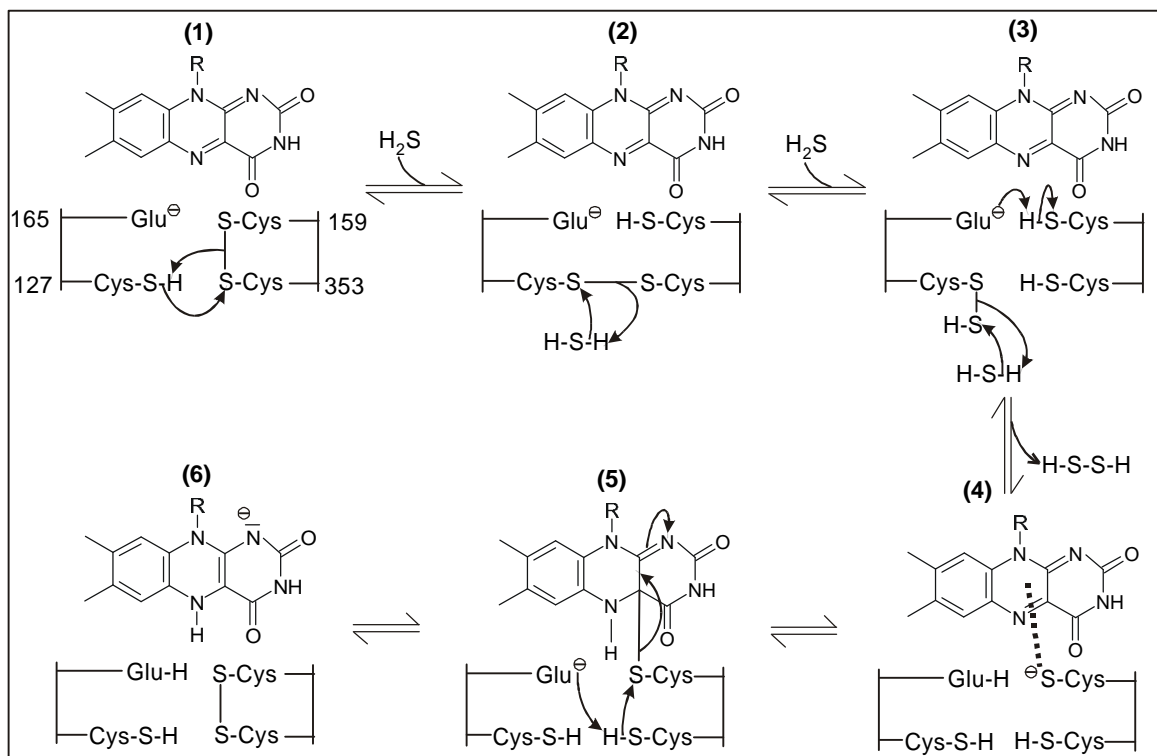


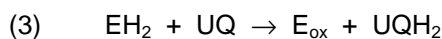
Abb. 6.3. Möglicher Mechanismus für die reduktive Halbreaktion der SQR. Die Positionen der drei Cysteine und des Glutamats sind in (1) gezeigt. Details: s. Text.

Im Zusammenhang mit der reduktiven Halbreaktion muß auch die Rolle von Val300 betrachtet werden. Die SQR unterscheidet sich von anderen Vertretern der Disulfid-Oxidoreduktasen durch die Anwesenheit eines Valins (bzw. eines Isoleucins bei *Thiobacillus ferrooxidans*) in der dritten Flavinbindedomäne an Stelle eines Aspartats. Das als SQR postulierte Protein HMT2 aus Hefe, das in *in vitro* SQR-Aktivität aufweist, zeigt an der entsprechenden Position ein Aspartat, was es von der SQR unterscheidet. Darüberhinaus weist HMT2 für beide Substrate K_M -Werte von 2 mM auf (Vande Weghe und Ow, 1999), obwohl Hefe so hohe Konzentrationen an Sulfid nicht toleriert. Die

entsprechenden Werte liegen für die SQR im μM -Bereich (Griesbeck et al., 2000). Dies stellt die Rolle von HMT2 als SQR deutlich in Frage (s. 4.2.4., S. 19f). Der Austausch von Val300 in der SQR führt zu einer drastischen Erhöhung des K_M -Werts für Sulfid von $5 \mu\text{M}$ auf über $400 \mu\text{M}$, der K_M für Chinon steigt deutlich, aber weniger drastisch auf $28 \mu\text{M}$. Der Austausch der Aminosäure, der die SQR von HMT2 und den anderen Flavoproteinen dieser Familie unterscheidet, führt also hinsichtlich der Affinität zu Sulfid zu einem HMT2-ähnlichen Enzym. Dagegen weist FCC trotz des Aspartats in der dritten Flavin-Bindedomäne an dieser Stelle mit einem K_M -Wert von $12,5 \mu\text{M}$ eine ähnlich hohe Affinität zu Sulfid auf wie die SQR (Cusanovich et al., 1991). Die starke Herabsetzung der Affinität für Sulfid in der SQR durch die Mutation Val300Asp könnte durch zwei Mechanismen verursacht sein. Zum einen wird das Redoxpotential enzymgebundenen Flavins durch negativ geladenen Aminosäuren in der Umgebung in negative Richtung verschoben, wie bereits in Abschnitt 6.2.7. (S. 64ff) erwähnt (Ghisla und Massey, 1989). Im Fall der SQR könnte deshalb durch die Mutation das Potential so weit ins Negative verschoben sein, daß erst durch höhere Sulfidkonzentrationen eine Reduktion des enzymgebundenen Flavins möglich ist. Allerdings sollte in diesem Fall das Redoxpotential noch negativer als -200 mV sein, was dem Mittelpunktspotential des Redoxpaares Sulfid / Disulfid entspricht. Eine Verschiebung des Redoxpotentials von $+186 \text{ mV}$ um 400 mV durch eine Mutation erscheint allerdings wenig wahrscheinlich. Die Flavoproteinuntereinheit von FCC, die das entsprechende Aspartat in der Nähe des Flavins aufweist, besitzt bzgl. des Flavins ein Mittelpunktspotential von -26 mV (Meyer et al., 1991), was eine Reduktion durch Sulfid ermöglicht. Zum anderen könnte die negative Ladung des Aspartats in der Nähe der Bindestelle des Sulfids den Zugang des ebenfalls negativ geladenen HS^- -Moleküls erschweren. Im für die SQR vorgeschlagenen Strukturmodell weist Val300 einen Abstand von $9 - 10 \text{ \AA}$ zu den drei essentiellen Cysteinen auf, die die Bindestelle für Sulfid im postulierten Modell darstellen (s. Abschnitt 6.3., S. 67ff). Aufschluß über den verantwortlichen Mechanismus könnten die Bestimmung des Redoxpotentials der mutierten SQR und die Klärung der Kristallstruktur der SQR geben.

6.4.3. Die oxidative Halbreaktion

Die oxidative Halbreaktion der SQR-Reaktion stellt die Chinon-abhängige Oxidation von EH_2 dar:



Da bei den strukturell und mechanistisch gut charakterisierten Vertretern der Disulfid-Oxidoreduktase-Familie wie GR, LipDH, TRR und MR das Substrat ein Nicotinamid-Nukleotid ist, konnten diese nicht zum Vergleich mit der SQR-Reaktion herangezogen werden. Ein Flavoprotein, das ohne die Beteiligung weiterer Coenzyme die Reduktion von Chinon katalysiert, ist die NAD(P)H:Chinon Oxidoreduktase, wegen ihrer Reaktivität mit NADH und mit NADPH auch als DT-Diaphorase bezeichnet (Tedeschi et al., 1995). Dieses dimere Enzym, das ein FAD pro Untereinheit als prosthetische Gruppe besitzt, ist weit verbreitet in tierischem Gewebe und katalysiert die Nicotinamid-Nukleotid-abhängige Reduktion von Chinonen, Chinonimiden, Azofarbstoffen und Nitrogruppen (Li et al., 1995). Induktion der DT-Diaphorase führt zu Schutz des Gewebes vor den toxischen und neoplastischen Effekten von Chinonen (ebd.). Ein Merkmal der DT-Diaphorase ist

die Funktion als $2 e^-$ -Überträger unter Bildung von Hydrochinon, ohne daß ein Semichinon detektierbar ist. Diese Eigenschaft steht in Einklang mit den beobachteten Redoxeigenschaften der SQR, die ebenfalls ein $2 e^-$ -Überträger ist (s. 5.2.9., S. 33ff), so daß die DT-Diaphorase gut zum Vergleich mit dem Mechanismus der SQR-Reaktion herangezogen werden kann, obwohl ein Sequenzvergleich keine weiteren gemeinsamen Merkmale zeigt. Die DT-Diaphorase besitzt eine Bindestelle, an der nacheinander NAD(P)H und Chinon binden. Bei dem Elektronentransfer handelt es sich um einen basenkatalysierten Hydrid-Transfer zwischen NAD(P)H und FAD bzw. zwischen FADH₂ und Chinon (Li et al., 1995). Da ein Tyrosin- und ein Histidinrest in der Kristallstruktur in unmittelbarer Nähe des Isoalloxazinrings gelegen sind, wurde diesen beiden Aminosäuren die Funktion als katalytische Base zugeschrieben (ebd.). Während der Austausch des Histidins gegen einen Glutaminrest mit einer deutlichen Aktivitätsabnahme auf 8 % verbunden war, was die genannte Hypothese stützt, zeigte der Austausch des Tyrosins gegen Phenylalanin nur eine geringfügig verringerte Aktivität auf 35 %, so daß die Beteiligung dieses Tyrosins fraglich erscheint (Chen et al., 1999; Chen et al., 2000).

Aufgrund der Ergebnisse der sequenzspezifischen Mutagenese der SQR und auf Basis des für die DT-Diaphorase postulierten Mechanismus (s.o.) konnte ein möglicher Reaktionsmechanismus für die oxidative Halbreaktion der SQR formuliert werden, der in **Abb. 6.4.** (S. 82) dargestellt ist. Entscheidend ist dabei die Funktion der beiden in der SQR konservierten Histidine. Vor den Experimenten war aufgrund der Homologie mit einem von Rich und Fischer (1999) postulierten Chinon-Bindemotiv angenommen worden, daß eines der Histidine für die Bindung von Chinon durch eine Wasserstoffbrücke zu einer Carbonylgruppe des Chinons verantwortlich sein könnte. Da die Affinität für Chinon nach dem Austausch jedes der beiden Histidine gegen Alanin aber nicht vermindert war (s. **Abb. 5.24.**, S. 46f), wie es nach dieser Hypothese zu erwarten gewesen wäre, scheint keines der beiden Histidine für die Bindung von Chinon verantwortlich zu sein. Die drastische Verminderung der Aktivität auf 20 % und die Veränderung der pH-Abhängigkeit im Fall der Mutation His131Ala deuten eher auf eine fehlende Säurekatalyse bei Abwesenheit des Histidins hin. Das Wildtyp-Enzym weist ein pH-Optimum von 6,7 und ein kleineres Optimum im Bereich von pH 5,0 auf (s. **Abb. 5.7.**, S. 29). Dagegen scheint durch die Mutation His131Ala das Aktivitätsmaximum im Neutralen zu fehlen, während das Optimum im Säuren bei pH 4,5 beinahe unverändert ist (s. **Abb. 5.25.**, S. 48). Dies deutet auf zwei verschiedene Mechanismen der Katalyse hin. Im Neutralen wird die Reaktion durch His131 katalysiert, was bei der SQR-His131Ala nicht möglich ist. Im Säuren dagegen wird die Reaktion durch Protonen aus der Umgebung katalysiert, was auch bei der SQR-His131Ala der Fall ist. Daß dieses Histidin in der oxidativen Halbreaktion mitwirkt, zeigt die unvollständige Reoxidation des reduzierten Enzyms durch Chinon bei der Fluoreszenzmessung (s. **Abb. 5.25.**, S. 48). Möglicherweise könnte bei einer Änderung des pH-Wertes ins Saure vollständige Reoxidation in der Fluoreszenz beobachtet werden. Das zweite Histidin (His196) scheint eine weniger wichtige Rolle in der Katalyse zu spielen, da durch die Mutation zu Alanin sowohl der Aktivitätsverlust auf 38 % als auch die Änderung der pH-Abhängigkeit um 0,5 pH-Einheiten ins Saure geringer sind als die durch die Mutation His131Ala verursachten Effekte. Dennoch kommt offensichtlich auch diesem Histidin eine Rolle in der Säure- bzw. Basen-Katalyse während der SQR-Reaktion zu.

Im ersten Schritt der Reaktion (Struktur (1) in **Abb. 6.4.**, S. 82) kann das protonierte His131 ein Proton in die Nähe der Carbonylgruppe des oxidierten Chinons bringen, so daß ein Angriff der Carbonylgruppe auf das Proton stattfinden kann. Auch Protonen aus der Umgebung können dies bewirken, wie das kleinere pH-Optimum bei pH 4,5 - 5,0 zeigt. Dies löst eine Änderung in der elektronischen Struktur des Chinons aus, durch die der Transfer eines Hydrids vom Atom N(5) des reduzierten Flavins auf die zweite Carbonylgruppe des Chinons möglich ist. Durch die synchrone Übertragung eines Protons vom N(1)-Atom des Flavins auf das deprotonierte His196 liegt das Flavin wieder oxidiert vor (2). Ein Semichinon kann aufgrund der Hydridübertragung zu keinem Zeitpunkt der Reaktion beobachtet werden. In Einklang damit zeigte auch die Redox titration der SQR keine Stabilisierung eines Semichinons. Das somit reduzierte Hydrochinon (2) kann das oxidierte Enzym verlassen. Nach Reprotonierung von His131 durch His196 liegt das Enzym wieder im oxidierten Ausgangszustand vor (3). Dieses Modell berücksichtigt die unterschiedlich starke Bedeutung der beiden Histidine. Der Angriff der Chinon-Carbonylgruppe auf das Proton von His131 ist entscheidender, da dadurch die ganze Reaktion ausgelöst wird. Dagegen besteht die Aufgabe von His196 einerseits in der Deprotonierung des Atoms N(1) des Flavins, das aber ohnehin deprotoniert vorliegen kann, wie der pK des freien FADH₂ von 6,5 (Massey und Hemmerich, 1980) nahelegt, und andererseits in der Reprotonierung von His131. Diese Funktion scheint aber bei pH 6,2 auch durch Protonen aus der Umgebung geschehen zu können, was die leichte Verschiebung des pH-Optimums von 6,7 auf 6,2 im Fall der Mutation His196Ala zeigt (s. **Abb. 5.25.**, S. 48). Wenn bei der SQR-His196Ala die Reprotonierung von His131 geschwindigkeitsbestimmend ist, läßt dies wiederum Rückschlüsse auf den pK von His131 zu. Die halbmaximale Aktivität von His196Ala kann aus **Abb. 5.25.** (S. 48) in der rechten Flanke der Optimumskurve bei pH 7,1 abgelesen werden, was gemäß dem vorgeschlagenen Modell dem pK von His131 entsprechen könnte. Der pK von His196 läßt sich aus den vorliegenden Daten nicht ablesen, er sollte aber unterhalb von 7,1 liegen, wenn His131 durch His196 protoniert wird.

Es sollte hier allerdings ergänzt werden, daß die beiden Histidinreste im Strukturmodell, das in Abschnitt 6.3. (S. 67ff) diskutiert wird, Abstände von mindestens 15 Å zu dem Isoalloxazinring des Flavins aufweisen, so daß sie die beschriebenen Funktionen nicht wahrnehmen könnten. Allerdings basiert das Strukturmodell auf der Flavoproteinuntereinheit von FCC, das keine Chinon-Bindestelle aufweist, sondern mit Cytochrom c wechselwirkt, so daß das Strukturmodell zumindest bzgl. der Bindung und Reduktion von Chinon von der tatsächlichen Struktur der SQR abweichen dürfte.

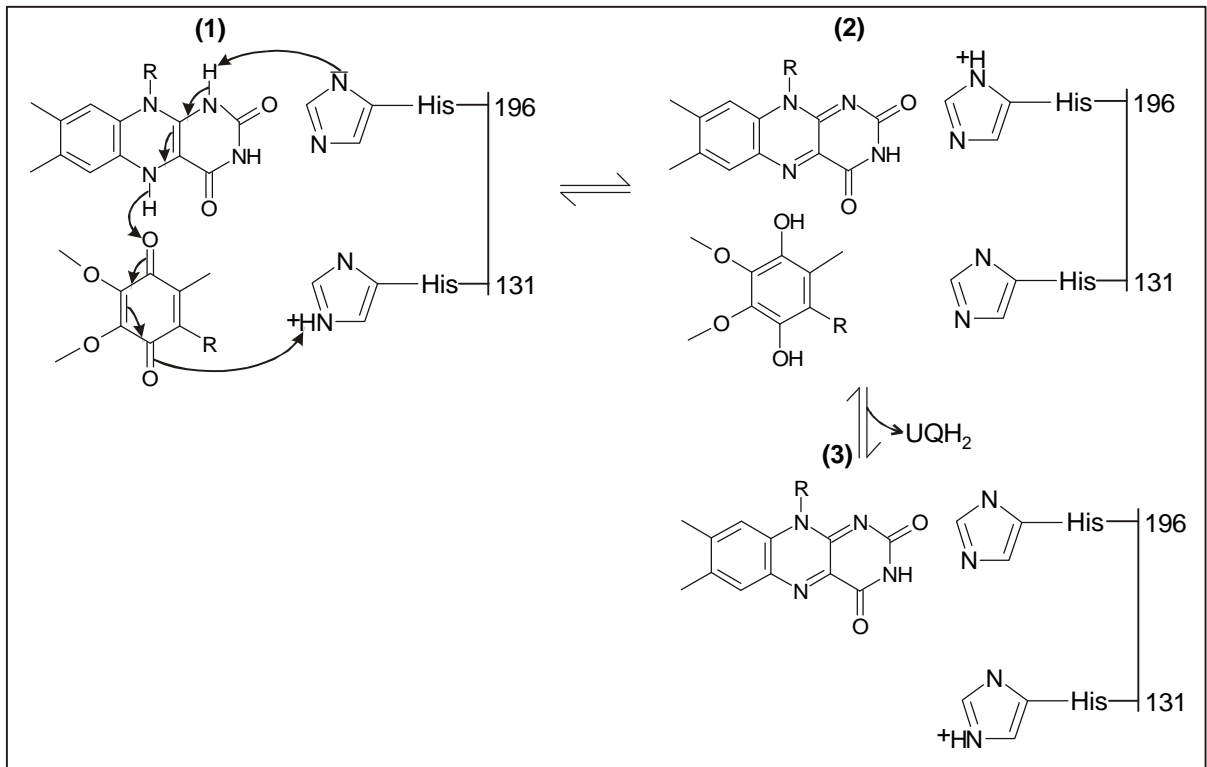


Abb. 6.4. Möglicher Mechanismus für die oxidative Halbreaktion der SQR. Details: s. Text.

7. Ausblick

Die Oxidation von Sulfid ist eine unter Prokaryoten weit verbreitete Reaktion. Während eine Rolle von FCC in der Sulfidoxidation noch immer als ungeklärt zu betrachten ist, scheint die SQR das für diesen wichtigen Stoffwechselweg verantwortliche Enzym zu sein, was durch das Vorkommen dieses Enzyms in phylogenetisch entfernten Gruppen innerhalb der Bakterien unterstrichen wird (Griesbeck et al., 2000). Über den Mechanismus der Sulfidoxidation lagen bisher keine Daten vor. In der vorliegenden Arbeit wurde nun ein Verfahren vorgestellt, mit dessen Hilfe es erstmals möglich wurde, die für strukturelle und mechanistische Untersuchungen nötigen Mengen an Enzym zur Verfügung zu stellen. Auf dieser Basis wurden durch gerichtete Mutagenese und Produktanalyse Untersuchungen vorgenommen, die erstmals einen Einblick in den Reaktionsmechanismus der SQR aus *Rb. capsulatus* erlauben.

Diese Versuche stellen jedoch erst einen Anfang in der physikochemischen Charakterisierung der SQR dar. Für weitere Experimente wäre es wünschenswert, den FAD-Gehalt im Enzym durch modifizierte Expressionsbedingungen, z.B. unter einem schwächeren Promotor in *E. coli*, oder durch moderate Überexpression im ursprünglichen Organismus *Rb. capsulatus* zu erhöhen. Auf dieser Grundlage könnten weitere mechanistische Untersuchungen angestellt werden. Zum einen könnten noch Mutationen einer Reihe weiterer konservierter Aminosäuren konstruiert und die Charakterisierung der resultierenden Enzyme vorgenommen werden. Auf diese Weise könnte u.a. geklärt werden, ob Glu165 tatsächlich die an der reduktiven Halbreaktion beteiligte Base ist. Weiterhin könnte die mögliche Rolle verschiedener aromatischer Aminosäuren an der Bindung des Chinons überprüft werden. Zum anderen stehen eingehende spektroskopische Untersuchungen an der SQR noch aus, mit deren Hilfe die Bildung des Charge Transfer-Komplexes und des postulierten Thiol-Flavin-C(4a)-Addukts überprüft werden und die Kinetik der beteiligten Teilreaktionen beleuchtet werden könnte. Auch chemische Modifikation des Proteins wie Alkylierung von Cysteinen oder die Inkorporation modifizierter Flavine könnten weitere Einblicke in die SQR-Reaktion ermöglichen. Die Verbindung der gerichteten Mutagenese mit spektroskopischen Kinetikmessungen sollte das Verständnis der SQR-Reaktion beträchtlich erweitern, wie es im Fall der verwandten Flavoproteine Glutathion Reduktase, Lipoamid-Dehydrogenase, Thioredoxin Reduktase oder Mercuri Reduktase geschehen ist (Williams Jr., 1992). Weiterhin liefert die einfache Reinigung überexprimierter SQR auch die Mengen an Enzym, die für eine Kristallisation benötigt werden. Die Strukturaufklärung der SQR würde einen bedeutenden Schritt bei der Untersuchung des Mechanismus der Sulfidoxidation bedeuten.

Einen weiteren wichtigen Gesichtspunkt stellt die Regulation der Sulfidoxidation in Prokaryoten dar. In *Rb. capsulatus* erfolgt die Induktion der Expression bei Anwesenheit von Sulfid, ein terminaler Elektronenakzeptor wie Sauerstoff bewirkt aber eine deutliche Verstärkung der Induktion, so daß eine Überreduktion des Chinonpools verhindert wird (Griesbeck et al., 2000; Bathe, 2001). Möglicherweise wirken Regulationen auf Expressionsebene und auf Proteinebene zusammen. Deshalb müßte untersucht werden, ob Redoxeeigenschaften und/oder Enzymaktivität der SQR

durch die Substrate Sulfid und Chinon oder auch durch andere Faktoren wie Sauerstoff allosterisch beeinflusst werden, wie es für die Succinat-Dehydrogenase oder die D-Aminosäure-Oxidase beschrieben ist (Stankovich, 1991).

Aufgrund der Verbreitung bei phylogenetisch wenig verwandten Bakterien wird die SQR als ein in der Evolution sehr früh entstandenes Enzym betrachtet. Deshalb wäre das Vorkommen dieses Enzyms bei Archaeen nicht überraschend. Trotzdem konnte bisher noch kein Gen in Archaeen identifiziert werden, das für ein Protein mit hoher Homologie zur SQR kodiert. Untersuchungen zur SQR-Aktivität in Membranen sulfidoxidierender Archaeen könnten Aufschluß über das Vorkommen dieses Enzyms in dieser Domäne des Lebens bringen. Auch das Vorkommen der SQR in Mitochondrien von Eukaryoten bedarf noch genauerer Untersuchung. Die Beteiligung des Cytochrom *bc*₁-Komplexes am sulfidabhängigen Elektronentransport wurde bei dem Wattwurm *Arenicola marina* (Grieshaber und Völkel, 1998) und bei der Muschel *Geukensia demissa* nachgewiesen (Parrino et al., 2000), SQR-Aktivität konnte bereits in Mitochondrien des Wattwurms *Arenicola marina* gezeigt werden (M. Klein, M. Schütz, G. Hauska und M.K. Grieshaber, persönliche Mitteilung). Bisher wurde jedoch noch kein SQR-Protein aus Eukaryoten isoliert. Das Protein HMT2 aus der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* katalysiert zwar *in vitro* die sulfidabhängige Reduktion von Chinon (Vande Weghe und Ow, 1999), es erscheint aber fraglich, ob dies auch die physiologische Funktion dieses Enzyms ist (s. Abschnitt 4.2.4., S. 19f). Darüberhinaus müßte geklärt werden, ob eine SQR für die Sulfid-oxidierende Aktivität, die auch in verschiedenen Geweben höherer Eukaryoten nachgewiesen werden konnte (Furne et al., 2001; Yong und Searcy, 2001), verantwortlich ist. Damit könnte man sich der Frage nähern, ob der Mechanismus der Sulfidoxidation in allen Domänen des Lebens auf einem einzigen Mechanismus beruht, dem der SQR-Reaktion.

8. Material und Methoden

8.1. Material

8.1.1. Organismen

Escherichia coli:

Stamm	Eigenschaften	Quelle
BL21(DE3)	F ⁻ , ompT, hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻), gal, dcm (DE3)	Studier et al., 1990
BMH 71-18 <i>mutS</i>	<i>thi</i> , <i>supE</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), [<i>mutS</i> :Tn10] [F ['] , <i>proA</i> ⁺ B ⁺ , <i>lacI</i> ^q ZΔM15]	Promega
DH10B	<i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), φ80d, <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rspL</i> , <i>nupG</i> {p3:Km, amber amp, amber tet}	Grant et al., 1990
HB101	<i>proA2</i> , <i>leu</i> , <i>hsdS20</i> (r _B m _B), <i>lacY1</i> , <i>recA1,3</i> <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl</i> , <i>supE44</i> , <i>mtl-1</i>	Maniatis et al., 1989
J-53	Amp ^r , Km ^r , Tc ^r , RP4, Konjugationshelferstamm	Denarie et al., 1977
JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , λ-, Δ(<i>lac-proAB</i>), [F ['] , <i>traD36</i> , <i>proA+B</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q ZΔM15]	Promega

Rhodobacter capsulatus:

Stamm	Eigenschaften	Quelle
DSM 155	Wildtyp (Typenstamm)	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (Braunschweig)
F14	Δ(<i>orf2-sqr</i>), SQR ⁻ , Km ^r , abgeleitet von DSM155	Schütz et al., 1999

8.1.2. Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Quelle
pHP45Ω	Amp ^r , Sm ^r , Spc ^r , enthält Ω-Kassette	Prentki und Krisch, 1984
pPSQR	Tc ^r , Sm ^r , Spc ^r , <i>oriT</i> _{RP4} ; pPHU233 mit 5400 bp <i>PstI</i> -Fragment aus pUSQRΩ mit ORF2 und <i>sqr</i>	Schütz et al., 1999
pRL528	Cm ^r , tra ⁺ , M.Aval, M.Eco47II, Hilfsplasmid für die Konjugation	Elhai und Wolk, 1988
pT7-7	Amp ^r , Φ10, Expressionsvektor	Tabor und Richardson, 1985
pTHSQR	Amp ^r , pT7-7 mit dem <i>sqr</i> -enthaltenden <i>NdeI</i> - <i>Bam</i> HI-Fragment aus pUSQR, <i>sqr</i> -Gen 5' modifiziert mit His-Tag und Enterokinase-Spaltstelle	diese Arbeit
pTSQR	Amp ^r , pT7-7 mit dem <i>sqr</i> -enthaltenden <i>NdeI</i> - <i>Bam</i> HI-Fragment aus pUSQR	Schütz et al., 1997
pUSQR	Amp ^r , pUC19 mit 3,5 kb <i>PstI</i> -Fragment <i>Rb. capsulatus</i> DNA mit <i>sqr</i> -Gen	Schütz et al., 1997
pUSQRΩ	Amp ^r , Sm ^r , Spc ^r , pUSQR mit Ω-Kassette aus pHP45Ω in <i>NotI</i> -Schnittstelle	Schütz et al., 1999
RP4	Amp ^r , Km ^r , Tet ^r , konjugatives Plasmid	Denarie et al., 1977

8.1.3. Chemikalien

Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien:

Agarose (SeaKem GTG)	FMC Bioproducts (Rockland, USA)
Antibiotika	Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin: Sigma (Deisenhofen, Deutschland) Spectinomycin: Serva (Heidelberg, Deutschland)
D-Aminosäure-Oxidase	Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland)
Decylubichinon (2,3-Dimethoxy-5-methyl-6-decyl-1,4-benzochinon)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Detergentien	Thesit: Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland) Dodecylmaltosid: Glycon (Luckenwalde, Deutschland)
Enzyme für molekularbiologisches Arbeiten	Fermentas (Vilnius, Litauen) New England Biolabs (Beverly, USA) Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland) Pharmacia (Uppsala, Schweden)
FAD	Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland)
IPTG (biological grade)	Biotech GmbH (Gaiberg, Deutschland)
Kits für molekularbiologisches Arbeiten	Macherey und Nagel (Oensingen, Schweiz) Promega (Madison, USA) Qiagen (Hilden, Deutschland) Stratagene (La Jolla, USA) Bio-RAD (Hercules, USA)
Mediatoren für Redoxtitration	HDBT-Gemisch (5-n-R-6-hydroxy-4,7-dioxobenzothiazol mit R = Heptyl, Nonyl, Undecyl, Tridecyl, Pentadecyl): Dr. B. Trumppower, Department of Biochemistry, Dartmouth Medical School, Hanover, USA 2-Hydroxy-1,4-Naphtochinon: Eastman, Rochester, USA Menadion, 1,4-Naphtochinon: Fluka, Buchs, Schweiz
Medien (Bacto-Trypton, Yeast-Extract)	Difco (Detroit, USA)
Monobrombiman	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Na ₂ ³⁵ S	Hartmann Analytik (Göttingen, Deutschland)
Oligonukleotide	MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland)

8.1.4. Medien

8.1.4.1. *E. coli*: Luria Broth (LB) (Maniatis et al., 1989)

Bacto-Trypton	10 g
Yeast-Extract	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1 l

8.1.4.2. *Rb. capsulatus*: RCV-Medium (Weaver et al., 1975) und Minimal-Medium

DL-Malat	4 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,12 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	75 mg/l
EDTA	20 mg/l
KH ₂ PO ₄ / K ₂ HPO ₄	0,6 / 0,9 g/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	12 mg/l
Thiamin-HCl	1 mg/l
Mn ₂ SO ₄ x H ₂ O	1,6 mg/l
H ₃ BO ₃	2,8 mg/l
Cu(NO ₃) ₂	0,04 mg/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,24 mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,76 mg/l

Minimal-Medium (MM-Medium) für photoautotrophes Wachstum wurde wie RCV, aber ohne Malat angefertigt (Schütz et al., 1999).

8.1.4.3. PY-Medium (für Konjugation, s. 8.2.2., S. 89) (Maniatis et al., 1989)

Casein-Pepton	10 g/l
Yeast-Extract	0,5 g/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,41 g/l
CaCl ₂	0,21 g/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	10 mg/l

8.1.4.4. Agarplatten

Für Agarplatten wurden 15 g/l Agar zum jeweiligen Medium gegeben. Top-Agar (für Konjugation, s. 8.2.2.) enthielt 7,5 g/l Agar.

8.1.4.5. Antibiotika

Antibiotika wurden sterilfiltriert, Zugabe erfolgte nach dem Autoklavieren des Mediums. Es wurden folgende Arbeitskonzentrationen verwendet:

Ampicillin	50 µg/ml
Chloramphenicol	10 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml
Spectinomycin	25 µg/ml

8.2. Molekularbiologische Methoden

8.2.1. Standardmethoden

8.2.1.1. Plasmidisolierung, Restriktionsverdau, Agarose-Gele, Ligationen und DNA-Gelextraktion

Plasmid-DNA wurde mit Kits der Firmen Qiagen (Hilden, Deutschland), Macherey und Nagel (Oensingen, Schweiz) und Bio-RAD (Hercules, USA) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Restriktionsverdau, Ligationen und Agarose-Gele wurden gemäß Maniatis et al. (1989) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben angewandt. Über Agarosegele aufgetrennte DNA wurde mit NucleoSpin-Extraction-Gelex (Macherey und Nagel, Oensingen, Schweiz) und Qiaquick (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben extrahiert.

8.2.1.2. CaCl₂-Transformation von *E. coli* (Cohen et al., 1972)

a) 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 OD₅₇₈ von 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden in einem SS34-Rotor bei 500 rpm und 4°C 5 min abzentrifugiert und vorsichtig in 40-50 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert. Nach Inkubation auf Eis für 30 min wurden die Zellen im SS34-Rotor bei 2500 rpm und 4°C für 5 min pelletiert. Ein ringförmiges Pellet ist Zeichen für eine erfolgreiche Prozedur. Die Zellen wurden in 5 ml 0,1 M eiskaltem CaCl₂ aufgenommen und für 2 h auf Eis inkubiert. Danach wurden sie transformiert oder portioniert in N₂ (l) für die Aufbewahrung bei -70°C eingefroren.

b) 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 *E. coli* (Dower et al., 1988)

a) Herstellung kompetenter Zellen

1 l LB-Medium wurde mit 10 ml einer frischen ÜN-Kultur angeimpft und im Luftschüttler bei 37°C bis zu einer OD₆₆₀ von 0,5 - 1 inkubiert. Die Zellen wurden 20 min auf Eis inkubiert und im GSA-Rotor bei 4°C und 5000 rpm (4000 g) für 15 min pelletiert. Der Ansatz wurde dreimal gewaschen und abzentrifugiert wie oben angegeben. Der erste Waschschrift erfolgte mit 1 l sterilem, kaltem Wasser, der zweite mit 0,5 l Wasser und der dritte mit 20 ml 10 % (v/v) sterilem, kaltem Glycerin. Danach wurden die pelletierten Zellen in 2,5 ml 10 % (v/v) sterilem, kaltem Glycerin aufgenommen, zu jeweils 40 µl portioniert, in flüssigem N₂ eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

b) Transformation

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach dem Mischen der Zellen mit der Plasmid-DNA wurde der Ansatz in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde in einer Elektroporationsapparatur (Bio-RAD Genepulser, Bio-RAD, Hercules, USA) bei 25 μ F, 200 Ω und 2,5 kV durchgeführt. Danach wurde der Ansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt, 1 h bei 37°C geschüttelt und auf LB-Platten ausplattiert.

8.2.1.4. Herstellung von Glycerinkulturen

500 μ l einer frischen ÜN-Kultur wurden mit dem gleichen Volumen 87 % (v/v) Glycerin (steril) gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

8.2.1.5. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Bereichen durch PCR wurde in einem Thermocycler (Percin Elmer Cetus, Percin Elmer, USA) durchgeführt. Die eingesetzte Menge an Template-DNA betrug standardmäßig 100 ng. Die Reaktionsansätze enthielten daneben 100 pmol der Oligonukleotide, jeweils 0,25 μ mol dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1,5 bis 2 mM MgCl₂ und Reaktionspuffer. Nach Denaturierung (5 min 94°C) wurden die Proben abzentrifugiert. Nach Zugabe von 1 Unit Taq-DNA-Polymerase wurden die Ansätze mit Paraffinöl überschichtet, und die Reaktion wurde gestartet. Die Annealingtemperatur wurde in der Regel 5°C unter der Schmelztemperatur der Oligonukleotide gewählt. Es wurden 35 Reaktionszyklen durchgeführt. Die erhaltenen Produkte wurden auf einem Agarosegel analysiert und gegebenenfalls aus dem Gel extrahiert.

8.2.2. Konjugation von *Rb. capsulatus* mit *E. coli* (modifiziert nach Elhai und Wolk (1988))

Um Plasmid-DNA in *Rb. capsulatus* einzubringen, wurde Konjugation mittels „Triparental Mating“ durchgeführt. Pro Konjugationsansatz wurden 10 ml LB-Medium (25 μ g/ml Km + 50 μ g/ml Amp) mit 1 ml einer ÜN-Kultur *E. coli* J53-RP4 (Konjugationshelferstamm) sowie 10 ml LB-Medium (10 μ g/ml Cm + 25 mg/ml Spc) mit 1 ml einer ÜN-Kultur von *E. coli* HB101-pRL528/pPSQR (Konjugationshelferplasmid und zu übertragendes Plasmid) angeimpft. Nach 2 h Wachstum bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert, mit je 5 ml PY-Medium gewaschen und anschließend in je 50 μ l PY-Medium resuspendiert. 2 ml vom *Rb. capsulatus*-Empfängerstamm wurden aus einer frischen Stationärkultur entnommen, abzentrifugiert, mit 1 ml PY-Medium gewaschen und in 50 μ l PY-Medium resuspendiert. Alle drei Kulturen wurden dann nacheinander auf dieselbe antibiotikafreie PY-Platte plattiert und für 16 - 20 h bei 30°C unter Beleuchtung inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit ca. 20 ml 40°C warmen RCV-Topagar (25 μ g/ml Spc) überschichtet und 2 Tage bei 30°C unter Beleuchtung inkubiert. Durch den Topagar durchgewachsene Kolonien von *Rb. capsulatus*-Exkonjuganten wurden dann zur Reinigung auf RCV-Medium (25 μ g/ml Spc), auf dem die Aminosäure-auxotrophen *E. coli*-Stämme nicht wachsen konnten, ausgestrichen.

8.2.3. Heterologe Expression des *sqr*-Gens aus *Rb. capsulatus* in *E. coli*

8.2.3.1. Konstruktion des Expressionsvektors pTHSQR

Für die heterologe Expression des *sqr*-Gens aus *Rb. capsulatus* in *E. coli* wurde das Plasmid pTHSQR im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) (Studier et al., 1990) verwendet. pTHSQR wurde erzeugt, indem mit dem *sqr*-Gen aus pUSQR (Schütz et al., 1997) eine PCR durchgeführt wurde, wobei der eine Primer (pMal-His6-SQR) vor dem 5'-Ende des *sqr*-Gens zusätzlich die Codons für 6 Histidine und die Erkennungssequenz der Protease Enterokinase (Asp₄-Lys) enthielt. Zusammen mit einem zweiten Primer (*sqr*187), der innerhalb des *sqr*-Gens band, wurde ein ca. 600 bp großes Fragment erzeugt, das mit *Nde*I und *Eco*RI geschnitten und in den ebenso geschnittenen pTSQR (Schütz et al., 1997) eingesetzt wurde. Die Klonierung erfolgte in *E. coli* DH10B (Grant et al., 1990). Nachdem die Sequenz überprüft worden war, wurde pTHSQR für die Expression in BL21(DE3) eingebracht. Das hinter dem Promotor für die T7-RNA-Polymerase befindliche *sqr*-Gen kann in *E. coli* BL21(DE3) durch IPTG induziert werden, da dieser Stamm im Genom das Gen für die T7-RNA-Polymerase hinter dem lac-Promotor trägt.

Sequenzen der Oligonukleotide für die PCR:

pMal-His6-SQR: 5'-AAA CAT ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GAT GAC GAT GAC -
AAA GCT CAT ATC GTG GTT CTG GGC GCC GG-3'

*sqr*187: 5'-GCC CGA CAT AGG GTT CCG-3'

Für den Fall, daß der N-terminale His-Tag keine ausreichende Wechselwirkung mit der Nickel-Säule gezeigt hätte, wie es bei einem Experiment mit einem C-terminalen His-Tag aufgetreten war (Griesbeck, 1998), hätte mit dem vorliegenden Konstrukt noch ein Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindeprotein erzeugt werden können, das mit einer alternativen Affinitätschromatographie hätte gereinigt werden können, was aber nach der erfolgreichen Reinigung mit Hilfe des N-terminalen His-Tags nicht weiterverfolgt wurde.

8.2.3.2. Induktion der Expression

Für die Expression wurde LB-Medium (50 µg/ml Amp) in einer Verdünnung von 1:100 mit einer frischen ÜN-Kultur angeimpft und im 37°C-Schüttler inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 (nach ca. 2,5 h) wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1,5 mM zugegeben. Nach weiteren ca. 7 h im 25°C-Schüttler wurden die Bakterien geerntet. Zur Kontrolle der Expression wurde ein Aliquot des Ansatzes abzentrifugiert, in SDS-Probenpuffer 5 min gekocht und mit SDS-PAGE ausgewertet.

Die Zellen wurden in einer Heraeus Variofuge 3 für 10 min bei 4000 rpm pelletiert. Danach wurde das Pellet zum Waschen in einem Zehntel des ursprünglichen Volumens 50 mM BisTris, pH 6,5, 2 mM MgCl₂ resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in 10 - 20 ml des gleichen Puffers aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren bzw. für die Isolierung der SQR aufgeschlossen.

8.2.4. Sequenzspezifische Mutagenese

8.2.4.1. Grundlagen

Die Mutagenese wurde mit dem Kit GeneEditor™ von Promega (Madison, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dieses System benützt die Ampicillin-Resistenz, die auf einem Plasmid vorliegt. Hierzu wird aus der Einzelstrang-DNA des Plasmids ein mutierter Gegenstrang erzeugt. An die Einzelstrang-DNA binden zwei Oligonukleotide, die jeweils in der Mitte eine Fehlpaarung aufweisen. Ein Oligonukleotid erzeugt die gewünschte Mutation in dem Insert, im vorliegenden Fall dem *sqr*-Gen, das zweite Oligonukleotid verändert das *bla*-Gen, das die Ampicillin-Resistenz kodiert, solchermaßen, daß eine neue zusätzliche Resistenz gegen den GeneEditor™ Selection Mix erzeugt wird. Durch eine DNA-Polymerase und eine DNA-Ligase wird der Gegenstrang vervollständigt und geschlossen. Mit dem Plasmid wird der reparaturdefiziente Stamm *E. coli* BMH 71-18 *mutS* transformiert, der die falschen Basenpaarungen nicht beseitigt. Durch Selektion auf den GeneEditor™ Selection Mix erhält man nur Plasmide mit der veränderten Amp-Resistenz. Da das Oligonukleotid, das die gewünschte Mutation in das Insert, in unserem Fall das *sqr*-Gen, einfügt, in fünffacher Menge verglichen mit dem zweiten Oligonukleotid zugegeben worden ist, enthält das neue Plasmid mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die gewünschte Mutation in dem Insert.

8.2.4.2. Mutagenese

Um Einzelstrang-DNA zu erhalten, wurden zu 2 µg pTHSQR 2 µl einer Lösung mit 2 N NaOH und 2 mM EDTA gegeben. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden für eine Ammoniumacetat-Fällung 2 µl 2 M Ammoniumacetat, pH 4,6 und 75 µl 100 % Ethanol zugegeben. Die Fällung erfolgte 30 min bei -70°C. Danach wurde der Ansatz 15 min bei 4°C zentrifugiert, das Pellet wurde mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen, 15 min zentrifugiert, getrocknet und in 100 µl 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA aufgenommen. Mit einem Aliquot wurde eine Mengenabschätzung auf einem Agarosegel vorgenommen.

Für das Annealing wurden zu 0,05 pmol der Einzelstrang-DNA 0,25 pmol des resistenzverändernden Selektionsoligonukleotids, 1,25 pmol des Mutationsoligonukleotids, 2 µl Annealing-Puffer und Wasser auf 20 µl zugegeben. Beide Oligonukleotide waren am 5'-Ende phosphoryliert. Der Ansatz wurde 5 min bei 75°C inkubiert, danach wurde die Temperatur innerhalb von 45 min kontinuierlich von 75°C auf 37°C abgesenkt. Nach Zugabe von 3 µl Synthese-Puffer, 1 µl T4-DNA-Polymerase, 1 µl T4-DNA-Ligase und Wasser ad 30 µl wurde der Ansatz 90 min bei 37°C inkubiert.

CaCl₂-kompetente *E. coli* BMH 71-18 *mutS* wurden mit 1,5 µl des Mutationsansatzes transformiert und ÜN in 4 ml LB mit 100 µl GeneEditor™ Selection Mix angezogen. Mit 5 - 10 ng Plasmid-DNA aus den ÜN-Kulturen wurde *E. coli* JM109 transformiert und auf LB-Platten ausplattiert, die 100 µl GeneEditor™ Selection Mix enthielten. Aus Klonen dieser Transformanten isolierte Plasmid-DNA wurde dann durch Sequenzierung auf das Vorhandensein der gewünschten Mutation überprüft.

Tab. 8.1. Für die Mutagenese verwendete Oligonukleotide. Die von der Originalsequenz abweichenden Basen sind jeweils fett gedruckt.

Mutation	Oligonukleotid
Cys127Ser	CAG TCG ATC AGC CAT ATC GA
His131Ala	CG ATC TGC CAT ATC GAC GCG GCC GAG GCG GCA GGA G
Cys159Ser	GGC GCC AGC AGC TTC GGC CC
His196Ala	CG GAA CCC TAT GTC GGG GCG CTG GGG CTG GAC GGG
Val300Asp	C GCG GTG GGG GAC TGC GTG GCG
Cys353Ser	AAC GCC GTC TCT CTG GCG GA

8.2.4.3. Klonierung der Mutationskonstrukte

Da der reparaturdefiziente Stamm *E. coli* BMH 71-18 *mutS* auch spontane Mutationen mit geringerer Effizienz beseitigt, wurden die gewünschten Mutationen jeweils mit einigen 100 bp großen Fragmenten aus dem mutierten Plasmid pTHSQR herausgeschnitten und in den ursprünglichen pTHSQR eingesetzt. Auf diese Weise mußten anstatt des gesamten *sqr*-Gens nur die Fragmente durch Sequenzierung auf eventuelle Fehler überprüft werden. Die für diesen Klonierungsschritt verwendeten Restriktionsenzyme sind in **Abb. 8.1.** und **Tab. 8.2.** dargestellt.

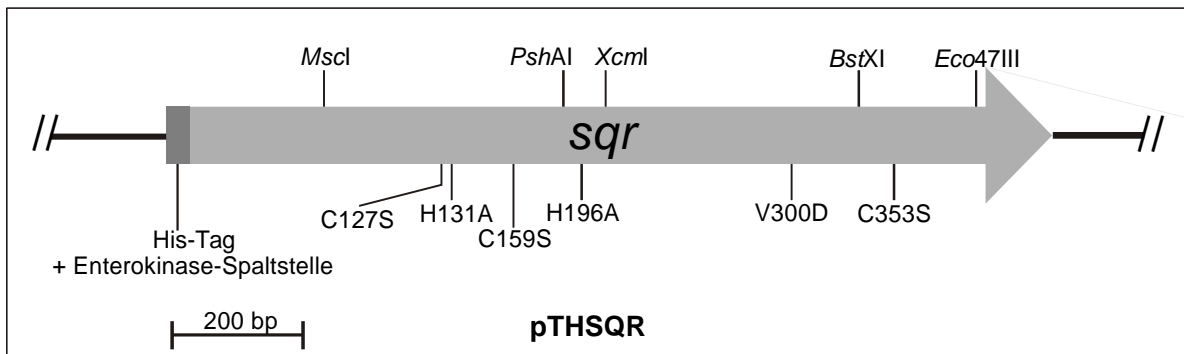


Abb. 8.1. Zur Klonierung der Mutationen in pTHSQR verwendete Restriktionsenzyme. Gezeigt sind die Positionen der Mutationen und der Restriktionsenzyme innerhalb des *sqr*-Gens in pTHSQR.

Tab. 8.2. Zur Klonierung der Mutationen in pTHSQR verwendete Restriktionsenzyme.

Mutation	Restriktionsenzyme
Cys127Ser	<i>MscI</i> - <i>PshAI</i>
His131Ala	<i>MscI</i> - <i>PshAI</i>
Cys159Ser	<i>MscI</i> - <i>PshAI</i>
His196Ala	<i>PshAI</i> - <i>BstXI</i>
Val300Asp	<i>XcmI</i> - <i>BstXI</i>
Cys353Ser	<i>BstXI</i> - <i>Eco47III</i>

Um die 3 Cystein-Serin-Mutationen in *Rb. capsulatus* F14 einzubringen, wurden die *sqr*-Gene mit den Mutationen jeweils in das Konjugationsplasmid pPHU233 eingebracht, so daß mutierte Formen von pPSQR erzeugt wurden. Hierzu wurde im Fall der Mutationen Cys127Ser und Cys159Ser ein mutiertes *Bs*WI-*Bst*XI-Fragment in pUSQR Ω eingesetzt. Das *Pst*I-Fragment aus diesem Konstrukt (pUSQR Ω -C127S bzw. pUSQR Ω -C159S) wurde schließlich in pPHU233 eingebracht, so daß die beiden mutierten pPSQR-Plasmide pPSQR-C127S und pPSQR-C159S daraus resultierten. Im Fall der Mutation Cys353Ser wurde ein mutiertes *Bs*WI-*Not*I-Fragment in pUSQR eingesetzt (pUSQR-C353S), danach wurde die *Sma*I-geschnittene (blunt) Ω -Resistenzkassette aus pHP45 Ω in die mit Klenow-Polymerase blunt gemachte *Not*I-Schnittstelle von pUSQR-C353S eingesetzt (pUSQR Ω -C353S). Das *Pst*I-Fragment aus diesem Konstrukt wurde schließlich in pPHU233 eingebracht, so daß das entsprechend mutierte Plasmid pPSQR-C353S entstand. Die Lage der Mutationen und der verwendeten Schnittstellen in den Plasmiden pTHSQR, pUSQR Ω und pPSQR ist in **Abb. 8.2.** gezeigt.

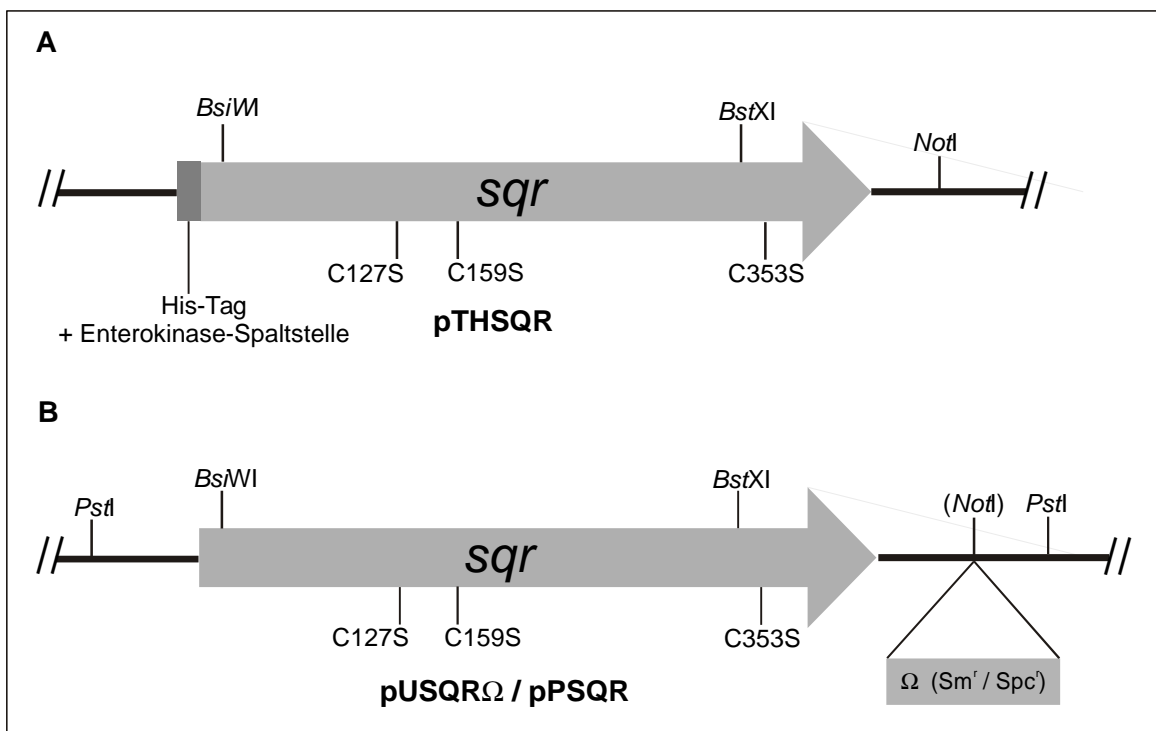


Abb. 8.2. Klonierung der 3 Cystein-Serin-Mutationen in den Konjugationsvektor pPSQR. Lage der Mutationen und der verwendeten Restriktionsschnittstellen in den verwendeten Plasmiden pTHSQR (A), pUSQR Ω und pPSQR (B). Die Abstände außerhalb des *sqr*-Gens sind aus Gründen der Anschaulichkeit nicht maßstabsgetreu dargestellt. Die *Not*I-Schnittstelle in pTHSQR (A) und pUSQR (an der entsprechenden Stelle, nicht gezeigt) ist in pUSQR Ω und pPSQR (B) nicht mehr vorhanden, da vor Einsetzen der Ω -Kassette die Schnittstelle mit Klenow-Polymerase blunt gemacht wurde. Details der Klonierung sind im Text beschrieben.

8.3. Biochemische Methoden

8.3.1. Wachstum von *Rb. capsulatus*

Rb. capsulatus Stämme wurden als Submers-Kulturen in RCV-Medium in mit Gummistopfen verschlossenen Serumflaschen in Volumina von 80 und 5 ml unter Beleuchtung bei 30°C ohne Schütteln gezogen. Die Zelldichte wurde über die OD bei 770 nm bestimmt.

Sulfidabhängige Wachstumsversuche auf RCV- und MM-Platten wurden in einem Oxid-Anaerobentopf durchgeführt. Die Sulfidatmosphäre wurde nach Irgens (1983) durch Mischen von 0,1 g Thioacetamid mit 1 ml 0,2 M HCl in einem 2 ml Eppendorfcup, das offen in den Anaerobentopf gestellt wurde, erzeugt. Zusätzlich wurde der offene Anaerobentopf vor Verschließen für ca. 2 min mit CO₂-angereicherter Druckluft (2% v/v CO₂) begast. Anschließend wurde der Anaerobentopf bei 30°C unter Beleuchtung inkubiert. Das Thioacetamid/HCl-Gemisch sowie die Begasung wurden täglich erneuert.

8.3.2. Bestimmung der Sulfidkonzentration in wässrigen Lösungen

(nach Pachmayr (1960); modifiziert nach Trüper und Schlegel (1964))

N,N-Dimethyl-p-phenylen-diamin-dihydrochlorid reagiert in saurer Lösung mit Eisen(III)-sulfat als Katalysator zunächst zu dem Intermediat Indammoniumsalz (Bindschedler's Grün), welches dann mit H₂S zu Methylenblau kondensiert. Das gebildete Methylenblau absorbiert bei einer Wellenlänge von 670 nm und ermöglicht dadurch eine quantitative Bestimmung des umgesetzten H₂S. Durch Vergleich der Absorption mit einer zuvor erstellten Eichgeraden kann so 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 ausfällt.

Zur Durchführung des Tests wurden 500 µl 2 % (w/v) Zinkacetat vorgelegt, dazu wurden 790 µl der zu bestimmenden Lösung (bzw. eine Verdünnung in H₂O) 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) H₂SO₄ zugegeben. Nach 20 min im Dunkeln wurde die OD₆₇₀ bestimmt, und die Sulfidkonzentration aus der Eichgeraden abgelesen.

8.3.3. Isolierung der heterolog exprimierten SQR aus *E. coli*

Die induzierten *E. coli*-Zellen wurden mit einer Spatelspitze DNase versetzt und gepottert. Zellaufschluß erfolgte durch dreimalige French Press-Behandlung. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Durch Zentrifugation (SS34, 7500 rpm, 20 min) wurden nicht-aufgebrochene Zellen und Zelltrümmer abgetrennt. Aus dem verbliebenen Überstand wurden die Membranen durch Ultrazentrifugation (Ti60, 45000 rpm, 1 h) sedimentiert, mit 50 mM BisTris/HCl, pH 6,5, 2 mM

MgCl₂ gewaschen, erneut zentrifugiert und in 50 mM BisTris/HCl, pH 6,5 resuspendiert. Solubilisierung erfolgte mit 0,6 % Thesit oder mit 0,6 % Dodecylmaltosid. Hierbei wurden die Membranen 1 h im Dunkeln auf Eis gerührt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (s.o.). Alternativ erfolgte die Solubilisierung mit 2 M NaBr. Hier wurde nach dem Rühren durch Zugabe von einem Volumen 50 mM BisTris/HCl, pH 6,5 die NaBr-Konzentration auf 1 M verdünnt, um die Sedimentation der Membranen zu gewährleisten. Anschließend erfolgte Ultrazentrifugation wie oben angegeben.

Für den letzten Schritt der SQR-Isolierung wurde mit den jeweiligen Überständen der Solubilisierungen Ni-NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt. Dazu wurde das Solubilisat mit 1/5 Volumen Ni-NTA-Agarose 2 h bei 6°C geschüttelt, um optimale Wechselwirkung des Säulenmaterials mit dem Protein sicherzustellen. Anschließend wurde der Ansatz auf eine Säule aufgetragen. Der Puffer für die Affinitätschromatographie setzte sich folgendermaßen zusammen:

50 mM Na-Phosphat, pH 6,0

300 mM NaCl

10 % Glycerin

0,025 % Thesit bzw. 0,27 mM Dodecylmaltosid bzw. kein Detergenz

Die Zugabe von Detergenz war abhängig von der Art, mit die Solubilisierung durchgeführt worden war.

Nach Waschen mit dem angegebenen Puffer erfolgte Elution mit von 50 bis 400 mM stufenweise steigenden Konzentrationen von Imidazol in Waschpuffer. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert.

Die vereinigten sauberen Fraktionen der Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden anschließend gegen 50 mM BisTris, pH 6,5 dialysiert, wobei im Fall der Detergenz-solubilisierten Proben Thesit bzw. Dodecylmaltosid in den oben angegebenen Konzentrationen zugegeben wurde. Im letzten Schritt der Isolierung wurden die Proben mit Proteinkonzentratoren der Firmen Pall Filtron (Northborough, USA) und Vivascience (Göttingen, Deutschland) aufkonzentriert.

8.3.4. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts wurde mit dem BCA-Test der Firma Pierce (Rochford, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Er basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der Cu²⁺ durch Proteine in alkalischem Medium zu Cu⁺ reduziert wird. Verantwortlich für die Reaktion sind Cystein-, Cystin-, Tryptophan- und Tyrosin-Reste. Die Cu⁺-Ionen reagieren dann mit Bicinchoninsäure zu einem wasserlöslichen Komplex, der bei 562 nm absorbiert und somit eine quantitative Bestimmung von Protein durch Spektroskopie erlaubt. Die Eichgerade wurde mit BSA-Proteinstandard erstellt.

8.3.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS-PAGE wurde nach Laemmli (1970) in Bio-RAD Minigel-Apparaturen (Bio-RAD; Hercules, USA) durchgeführt. Die Gele wurden mit Coomassie (Cabral und Schatz, 1979) oder Silber (ICN-Rapid-Ag-Stain, ICN, Irving, USA) gefärbt.

8.3.6. Bestimmung des FAD-Gehalts

8.3.6.1. Extraktion von Flavin aus Flavoproteinen

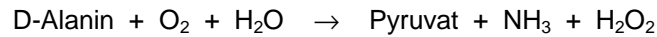
FAD wurde aus der SQR extrahiert und quantitativ bestimmt. Die Extraktion erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden. Bei der „H₂SO₄-Methode“ (Engels et al., 1997) wurde zur SQR-Lösung 1/10 Volumen 2 N H₂SO₄ gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde das denaturierte Protein 10 min in der Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert. Danach wurde der Überstand mit 1/5 Volumen 1 N NaOH neutralisiert. Bei der „KBr-Methode“ (Husain und Massey, 1979) wurden 1 Volumen 3 M KBr, 1 Volumen (NH₄)₂SO₄ (gesättigt) und 1/10 Volumen 1 N HCl zur Enzymlösung gegeben. Anschließend erfolgten eine Inkubation auf Eis und Zentrifugation wie oben angegeben. Der Überstand wurde mit 1/10 Volumen 1 N NaOH neutralisiert.

8.3.6.2. FAD-Bestimmung mit D-Aminosäure-Oxidase (Rao et al., 1967)

Zur quantitativen Bestimmung des FAD wurde D-Aminosäure-Oxidase-Apoprotein mit den extrahierten FAD-Proben aus der SQR rekonstituiert. D-Aminosäure-Oxidase (D-AOX) katalysiert die Oxidation von D-Aminosäuren zur entsprechenden α -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 O₂-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. Zur Isolierung des D-AOX-Apoproteins wurden zu 1 ml D-AOX-Holoenzym (5 mg/ml) 1 ml H₂O, 0,7 ml (NH₄)₂SO₄ (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. Die Extraktion mit 0,7 ml (NH₄)₂SO₄ und 0,8 ml 0,1 N HCl und 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. Zur enzymatischen Bestimmung der D-AOX-Aktivität nach FAD-Zugabe wurde in eine Sauerstoffelektrodenkammer folgender Ansatz vorgelegt:

500 μ l 0,1 M Tricin/NaOH, pH 8,0
300 μ l 0,1 M D-Alanin
10 μ l D-AOX-Apoprotein
ad 3 ml H₂O

Nachdem sich eine konstante Basislinie eingestellt hatte, wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 - 100 μl einer FAD-Probe gestartet. Dabei katalysiert die D-AOX folgende Reaktion:



Die Rate des O_2 -Verbrauchs ist dabei proportional zur Menge des zugegebenen FAD, wenn FAD limitierend, d.h. in geringerer Menge als das D-AOX-Apoprotein vorliegt. Eine Eichgerade wurde mit 10 - 100 μl einer 1 μM FAD-Lösung erstellt.

8.3.6.3. Fluorimetrische FAD-Bestimmung (abgewandelt nach Wilson und King (1964))

Nach Überführung von FAD in FMN durch Hitzebehandlung wurde die Fluoreszenzintensität in einem Shimadzu RF-5301 PC-Fluorimeter (Shimadzu, Japan) bestimmt. Aufgrund des Fehlens des Quenchers Adenin weist FMN eine ca. zehnfach höhere Fluoreszenzintensität im Vergleich zu FAD auf. Zur Überführung von FAD in FMN wurden zuerst H_2O ad 750 μl und 750 μl 0,2 N H_2SO_4 zugegeben. Dann wurden die Proben 45 min bei 95°C inkubiert. Danach erfolgten die Zugabe von 125 μl 2,5 M Na-Acetat, pH 4,8 und 375 μl H_2O und Zentrifugation (SS34, 14500 rpm, 20 min). Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität des Überstands bestimmt. Die Anregungswellenlänge war 436 nm, die Emission wurde bei 530 nm gemessen. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden bekannte Mengen an FAD in der gleichen Weise behandelt und vermessen.

8.3.7. Bestimmung der SQR-Aktivität (nach Shahak et al., 1994)

SQR-Aktivität wurde photometrisch über die sulfidabhängige Reduktion von decyl-Ubichinon (dUQ) ermittelt. Hierbei kann der Übergang von dUQ zu dUQH_2 anhand der Abnahme des Absorptionsmaximums bei 275 nm gemessen werden, ein isosbestischer Punkt für den Übergang liegt bei 300 nm. Zur Messung wurde ein Diodenarray-Spektrophotometer Specord S100B (Analytik Jena, Jena, Deutschland) verwendet.

Der Differenz-Extinktionskoeffizient $\epsilon_{275-300}$ für den Übergang von dUQ zu dUQH_2 wurde anhand des Extinktionskoeffizienten von dUQ ($\epsilon_{275} = 15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in EtOH; Morton, 1965) zu $12,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ermittelt. Hierzu wurde eine definierte Menge dUQ in Gegenwart eines Überschusses Sulfid und SQR vollständig reduziert. Aus dem Vergleich der Absorptionsspektren vor und nach Reduktion wurde $\epsilon_{275-300}$ berechnet (s. 5.2.1.1., S. 24f).

Um eine Verfälschung der Meßwerte durch sauerstoffabhängige Sulfidoxidation, Sulfidausgasung und dUQH_2 -Reoxidation zu verhindern, wurde die Messung in einer mit einem durchbohrten Teflonstopfen verschlossenen, gerührten Quarzküvette in zuvor mit N_2 begastem Meßpuffer durchgeführt. Außerdem wurden Glucose, Glucose-Oxidase und Katalase zugegeben, um auch Spuren von Sauerstoff zu beseitigen. Der 2 ml-Meßansatz enthielt:

50 mM BisTris, pH 6,5
50 mM Glucose
ca. 10 µg Glucose-Oxidase
ca. 10 µg Katalase
40 µM dUQ

Die Messung wurde bei 30°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ca. 60 µM Na₂S gestartet. Anhand der Anfangssteigung wurde die Aktivität der jeweiligen Probe berechnet. Die SQR-Aktivität wird angegeben als die Menge an reduziertem dUQ (dUQH₂) pro Zeit:

$$\frac{n(dUQH_2)}{t} ; \text{ Einheit: } 1U = \frac{1 \mu\text{mol}(dUQH_2)}{\text{min}}$$

Entsprechend wird die spezifische Aktivität in U/mg Protein angegeben.

Für die Messung der pH-Abhängigkeit der SQR-Reaktion wurde ein Gemisch aus 6 pH-Puffern gewählt, um den Einfluß verschiedener Puffersubstanzen und Salzgehalte auszuschließen. Das Gemisch enthielt je 20 mM MES, BisTris, MOPS, HEPES, Tricin und AMPPO. Der gewünschte pH wurde mit HCl bzw. NaOH eingestellt.

8.3.8. Detektion verschiedener Schwefelspezies durch HPLC (Rethmeier et al., 1997)

Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Jörg Rethmeier und Prof. Dr. Ulrich Fischer am Institut für Marine Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Bremen durchgeführt. Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung verschiedener Schwefelspezies nach SQR-Reaktion (Durchführung und Ansatz s. 8.3.7., S. 97f) wurden aus einem 1 ml-Reaktionsansatz 50 µl entnommen und in ein Eppendorf-Cup gegeben, in dem 50 µl 50 mM HEPES, pH 8,0, 5 mM EDTA, 50 µl Acetonitril und 10 µl 48 mM Monobrombiman in Acetonitril vorgelegt worden waren. Bei dieser Derivatisierungsreaktion werden die Thiolgruppen von Sulfid, Polysulfid, Sulfit und Thiosulfat durch den Fluoreszenzfarbstoff Monobrombiman markiert, so daß sie nach HPLC detektiert werden können. Nach Inkubation (30 min im Dunkeln) wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 65 mM Methansulfonsäure abgestoppt, und die Proben wurden weiterverarbeitet bzw. in N₂ (l) eingefroren. 100 µl aus den Proben wurden mit 100 µl des HPLC-Eluenten 88 % Essigsäure (0,25 %) / 12 % Methanol gemischt und durch HPLC auf einer LiChrospher 60, RP select B-Säule aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenz-Detektor bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einer Emission von 480 nm. Durch Vergleich der Retentionszeiten mit bekannten Schwefelspezies konnten die detektierten Signale qualitativ zugeordnet werden, durch Integration der Peaks wurde für Sulfid, Sulfit und Thiosulfat die Menge durch Vergleich mit Standard-Proben bestimmt. Polysulfid wird nur qualitativ erfaßt, da aufgrund der variablen Kettenlänge keine Quantifizierung möglich ist.

Elementarschwefel wurde aus 50 µl des Monobrombiman-derivatisierten Ansatzes mit 50 µl Chloroform extrahiert und mit HPLC auf einer LiChrospher 100, RP 18 Säule analysiert. Qualitative und quantitative Detektion erfolgte durch UV-Absorption bei 263 nm.

Die Sulfatbestimmung wurde mit der polaren Phase der Chloroform-Extraktion durchgeführt. Nach Separation durch eine Polyspher IC AN-1-Anionentauschersäule wurden die Proben durch UV-Messung bei 254 nm qualitativ und quantitativ detektiert.

8.3.9. Molekularsiebsäule Sephadex G-25

Um an die SQR kovalent gebundene Schwefelketten nachzuweisen, wurde nach Reaktion von SQR mit Na_2^{35}S die nicht-proteingebundene Radioaktivität durch eine Molekularsiebsäule abgetrennt. Dazu wurde das Säulenmaterial Sephadex G-25 fine ÜN in 250 mM Tris/HCl, pH 8,0 äquilibriert. Danach wurde 1 ml des Materials in eine 1 ml-Säule gefüllt und zentrifugiert (SS34, 2000 rpm, 1min). Das Säulenmaterial wurde mindestens dreimal mit 100 µl Puffer (s.o.) äquilibriert und zentrifugiert, bis das Durchlaufvolumen exakt 100 µl betrug. Danach konnte die Probe aufgetragen und zentrifugiert werden.

8.3.10. Isoelektrische Fokussierung mit einer Chromatofokussing-Säule

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punkts wurde Isoelektrische Fokussierung mit einer Chromatofokussing-Säule nach Angaben des Herstellers (Pharmacia, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Bei dieser Methode wird das Protein an die Matrix einer Ionentauschersäule gebunden. Elution erfolgt mit einem pH-Gradienten. Wenn der isoelektrische Punkt eines Proteins erreicht wird, eluiert das Protein aufgrund der fehlenden ionischen Wechselwirkung. Der isoelektrische Punkt eines Proteins liegt laut Herstellerangaben ca. 0,1 pH-Einheiten über dem Elutionsmaximum. Die Äquilibrierung der Säule (10 ml Säulenvolumen) erfolgte mit 25 mM Imidazol/HCl, pH 7,4, danach wurden 0,5 mg SQR aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 120 ml Polybuffer 74/HCl, pH 5,0 mit einer Laufgeschwindigkeit von 0,2 ml/min, es wurden Fraktionen von je 4 ml genommen. Auf diese Weise wurde ein pH-Gradient von 7,4 bis 5,0 angelegt. Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei 254 nm und durch SDS-PAGE.

8.3.11. 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.

8.3.12. Redox Titration (Dutton, 1978)

Zur Bestimmung des Mittelpunktspotentials des Flavins der SQR wurde das Absorptionsspektrum der SQR in Abhängigkeit des Redoxpotentials in einem Diodenarray-Spektrophotometer Specord S100B (Analytik Jena, Jena, Deutschland) gemessen. Durch Zugabe von Dithionit wurde das Potential in negativer Richtung verändert, durch Ferricyanid ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{III})(\text{CN})_6]$) in positiver Richtung. Das aktuelle Potential wurde mit einer Redoxelektrode Mettler Toledo Pt4800-M5 (Mettler Toledo,

Columbus, USA) bestimmt. Um den störenden Einfluß von Sauerstoff auf das Potential auszuschließen, wurde die mit einem Gummistopfen verschlossene Küvette mindestens 1 h vor Versuchsbeginn und während der gesamten Messung mit nachgereinigtem Stickstoff begast, der durch Durchleiten durch eine Lösung von 10 N NaOH und Dithionit vollständig sauerstofffrei gemacht wurde.

Die Eichung der Redoxelektrode erfolgte mit 4 Lösungen bekannten Potentials:

Lösung	Potential
$K_3[Fe(III)(CN)_6] : K_4[Fe(II)(CN)_6] = 1:1$	+430 mV
$K_3[Fe(III)(CN)_6] : K_4[Fe(II)(CN)_6] = 10:1$	+489 mV
$K_3[Fe(III)(CN)_6] : K_4[Fe(II)(CN)_6] = 1:10$	+ 371 mV
Quinhydrin (gesättigt) in 1 M Tris/HCl, pH 7,0	+280 mV

Außerdem wurden chinoide Redoxmediatoren zugesetzt. Diese vermitteln den Elektronenübergang zwischen Reduktions- bzw. Oxidationsmittel (also zwischen Dithionit bzw. Ferricyanid) und der SQR, da das FAD durch die Proteinumgebung zu stark abgeschirmt wäre (Dutton, 1978; Stankovich, 1991). Außerdem tragen sie zur Einstellung eines stabilen Potentials bei. Für die Titration wurde folgende Kombination von Mediatoren ausgewählt, bei der ein stabiles Potential eingestellt werden konnte (in Klammern das Mittelpunktspotential des jeweiligen Mediators): 2-Hydroxy-1,4-Naphtochinon (- 145 mV), HDBT-Gemisch (5-n-R-6-hydroxy-4,7-dioxobenzothiazol mit R = Heptyl, Nonyl, Undecyl, Tridecyl, Pentadecyl; - 40 mV), Menadion (0 mV), 1,4-Naphtochinon (+ 60 mV), 1,2-Naphtochinon (+ 145 mV). Die Titration wurde bei pH 7,0 durchgeführt.

Der Versuchsansatz (3 ml) enthielt:

200 mM Tris/HCl, pH 7,0

0,5 - 0,8 mg/ml SQR

0,025 % Thesit

7 μ M 2-Hydroxy-1,4-Naphtochinon

5 μ M HDBT-Gemisch

7 μ M Menadion

13 μ M 1,4-Naphtochinon

13 μ M 1,2-Naphtochinon

Spektren wurden im Abstand von ca. 10 mV aufgenommen, wenn für mindestens 5 min ein konstantes Potential angezeigt wurde. Das Absorptionsspektrum wurde im Bereich von 300-700 nm aufgenommen, um evtl. auftretende Absorptionsbanden von Semichinon im Bereich um 380 nm (Semichinon-Anion, „rotes Semichinon“) oder um 600 nm (neutrales Semichinon, „blaues Semichinon“) zu erfassen. Zur Änderung des Potentials wurden μ l-Mengen von Dithionit (5 mM / 50 mM / 500 mM in 1 M Tris/HCl, pH 7,0) bzw. Ferricyanid (5 mM / 50 mM in 1 M Tris/HCl, pH 7,0) zugegeben.

Zur Auswertung der Spektren wurden Differenzspektren berechnet, wobei jeweils das Spektrum des niedrigsten Potentials abgezogen wurde. Die Peakhöhe bei 450 nm wurde von einer Basislinie zwischen 400 und 520 nm, den angrenzenden lokalen Minima, aus berechnet. Zur Kontrolle wurde eine Titration der Mediatoren ohne SQR vorgenommen, um die Absorptionsänderungen der

Mediatoren bei der Auswertung berücksichtigen zu können. Die Ermittlung des Mittelpunktspotentials aus den Meßwerten wurde anhand der Nernst-Gleichung mit der Fit-Funktion der Software Microcal Origin (Microcal Software, Inc., Northampton, USA) und mit linearer Regression aus der logarithmischen Auftragung vorgenommen.

8.3.13. Circular Dichroismus-Spektroskopie (Schmid, 1989)

Circular Dichroismus (CD) ist die Eigenschaft optisch aktiver Moleküle, links- und rechts-circularpolarisiertes Licht gleicher Wellenlänge unterschiedlich stark zu absorbieren. Im Falle von Proteinen tritt CD aufgrund von asymmetrischen Kohlenstoffatomen und aromatischen Aminosäuren auf. Während asymmetrische C-Atome CD-Signale im Fern-UV-Bereich (180-250 nm) verursachen, aus denen sich Aussagen über die Sekundärstruktur, d.h. den Gehalt von α -Helix, β -Faltblatt oder Zufallsknäuel, ableiten lassen, liefert CD-Spektroskopie im Nah-UV-Bereich (250-340 nm) Informationen über die Tertiärstruktur des Proteins aufgrund der asymmetrischen Umgebung der aromatischen Aminosäuren im Protein. Besitzt ein Protein außerdem eine prosthetische Gruppe, die im sichtbaren Bereich absorbiert, läßt sich CD-Spektroskopie auch im sichtbaren Bereich durchführen, was Aussagen über die Umgebung des Cofaktors zuläßt. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Messungen im Fern-UV-Bereich verwendet, um Informationen über die Sekundärstruktur der SQR zu erhalten.

Die mittlere Elliptizität der Aminosäurereste (Θ_{MRW}) errechnet sich nach folgender Formel:

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot MRW \cdot 100}{d \cdot c}$$

Θ_{MRW} : mittlere Elliptizität der Aminosäurereste [$\frac{\text{Grad} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}}$]

Θ : gemessene Elliptizität [Grad]

MRW: mittleres Molekulargewicht der Aminosäurereste

($\frac{MW_{\text{Protein}}}{N - 1}$ mit: MW_{Protein} = Molekulargewicht des Proteins;
N = Anzahl der Aminosäuren des Polypeptids)

d: Schichtdicke der Küvette [cm]

c: Konzentration [mg/ml]

Die Messungen wurden in einem CD-Spektrophotometer des Typs AVIV CD62A-DS (AVIV, Lakewood, USA) mit einer 1 mm-Küvette durchgeführt. Mit Ausnahme der Versuche zur Hitze-abhängigen Denaturierung der SQR war die Küvette auf 25°C temperiert. Zur Messung wurde eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml in 50 mM Na-Phosphat, pH 6,5 eingesetzt. Für die Messung des Spektrums wurde pro 1 nm für 1 s gemessen, für den Temperaturübergang der Mittelwert über 10 s pro 1°C.

8.4. Computergestützte Berechnungen

8.4.1. Sequenzanalyse

Sequenzanalysen wurden mit der Software DNAMAN 4.0 (Lynnon BioSoft) durchgeführt, Sekundärstrukturvorhersagen mit dem Programm PHDsec 1.96 (Rost und Sander, 1993, <http://cubic.bioc.columbia.edu>).

8.4.2. Auswertung von CD-Spektren

Anhand der CD-Spektren der SQR und der Glutathion Reduktase wurden mit Hilfe der Software CDNN 2.1. (Universität Halle, http://bioinformatik.biochemtech.uni-halle.de/cd_spec/) die Anteile der Sekundärstrukturmotive α -Helix, antiparalleles β -Faltblatt, paralleles β -Faltblatt, β -Turn und Zufallsknäuel berechnet. Hierbei wurden die CD-Spektren und Strukturen von 13 untersuchten Proteinen (Cytochrom *c*, Hämoglobin, Lactat-Dehydrogenase, Lysozym, Myoglobin, Ribonuklease, Flavodoxin, Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, Subtilisin NOVO, Triosephosphat-Isomerase, Polyglutamat, Thermolysin und Hämyerthrin) als Standard zugrunde gelegt.

8.4.3. Strukturmodellierung

Die Strukturmodellierung der SQR wurde mit Hilfe von Hubert Riepl vom Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie (Lehrstuhl Prof. Kalbitzer) der Universität Regensburg mit der Software SYBYL 6.7. versucht. Dabei wurden die Röntgenkristallstrukturen der Glutathion Reduktase (Karplus und Schulz, 1987) und der Flavoproteinuntereinheit von Flavocytochrom *c* (Chen et al., 1994) zugrunde gelegt. Aufgrund der geringen Sequenzidentität zwischen der SQR und den beiden Musterproteinen, die bezogen auf die gesamte Länge der Sequenz nur bei 21 bzw. 23 % lag, konnte kein Modell erstellt werden. Deshalb wurde die Struktur von Flavocytochrom *c* (ebd.) als Strukturmodell für die SQR herangezogen, wobei die im Modell explizit gezeigten Aminosäuren von FCC mit Hilfe von SYBYL 6.7. gegen die entsprechenden Aminosäuren der SQR ausgetauscht wurden. Die Darstellung der Struktur erfolgte mit der Software Rasmol 2.6. (<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>).

9. Literatur

- Arieli, B., Padan, E. und Shahak, Y. (1991) Sulfide induced sulfide-quinone reductase activity in thylakoids of *Oscillatoria limnetica*. *J. Biol. Chem.* **266**, 104-111
- 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.* **268**, 5705-5711
- Bathe, S. (2001) Zur Regulation der Expression der Sulfid-Chinon-Reduktase (SQR) bei *Rhodobacter capsulatus*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenphysiologie der Universität Regensburg
- Blöthe, M. and Fischer, U. (2000) New insights in sulfur metabolism of purple and green phototrophic sulfur bacteria and their spheroblasts. *Microbiology 2000*, 12. -16. 3. 2000, München
- Boulégué, J. (1978) Solubility of elemental sulfur in water at 298 K. *Phosphors Sulfur Relat. Elem.* **5**, 127-128
- Bronstein, M., Schütz, M., Hauska, G., Padan, E. und Shahak, Y. (2000) Cyanobacterial sulfide-quinone reductase (SQR): cloning and heterologous expression. *J. Bacteriol.* **182**, 3336-3344
- Brune, D.C. (1989) Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **975**, 189-221
- Brune, D.C. (1995) Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. In: Anoxygenic photosynthetic bacteria (Blankenship, R.E., Madigan, M.T. und Bauer, C.E., Hrsg.) 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
- Burggraf, S., Olsen, G.J., Stetter, K.O. und Woese, C.R. (1992) A phylogenetic analysis of *Aquifex pyrophilus*. *System. Appl. Microbiol.* **15**, 352-356
- 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**, 8582-8587
- Cabral, F. und Schatz, G. (1979) High resolution one- and two-dimensional electrophoretic analysis of mitochondrial membrane polypeptides. *Methods. Enzymol.* **56**, 602-613
- Chen, S., Wu, K. und Knox, R. (2000) Structure-Function Studies of DT-Diaphorase (NQO1) and NRH: Quinone Oxidoreductase (NQO2). *Free Radical Biology & Medicine* **29**, 276-284
- Chen, S., Wu, K., Zhang, D., Sherman, M., Knox, R. und Yang, C.S. (1999) Molecular characterization of binding of substrates and inhibitors to DT-diaphorase: combined approach involving site-directed mutagenesis, inhibitor-binding analysis, and computer modeling. *Molecular Pharmacology* **56**, 272-278
- 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**, 430-432
- 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
- Cohen, Y., Jørgensen, B.B., Padan, E. und Shilo, M. (1975) Sulfide-dependent anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Nature* **257**, 489-492
- Cuello, A.O., McIntosh, C.M. und Rotello, V.M. (2000) Model Systems for Flavoenzyme Activity. The Role of N(3)-H Hydrogen Bonding in Flavin Redox Processes. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 3517-3521
- Cusanovich, M.A., Meyer, T.E. und Bartsch, R.G. (1991) Flavocytochrome c. In: Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes, Vol. II (Müller, F., Hrsg.) pp 377-393. CRC Press, Boca Raton

- Cusanovich, M.A., Meyer, T.E. und Tollin, G. (1985) Flavocytochrome *c* transient kinetics of photoreduction by flavin analogs. *Biochemistry* **24**, 1281-1287
- 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., Huber, R., Feldman, R.A., Short, J.M., Olsen, G.J. und Swanson, R.V. (1998) The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* **392**, 353-358
- Denarie, J., Rosenberg, C., Bergeron, B., Boucher, C., Michel, M. und Borate deGertalimio, M. (1977) Potential of RP4::Mu Plasmids for In Vivo Genetic Engineering of Gram-negative Bacteria. In: DNA Insertion Elements, Plasmides and Episomes (Bukhari, A.I., Shapiro, J.A. und Adhya, S.L., Hrsg.) pp 507-520. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Dower, J.D., Miller, J.F. und Ragsadl, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**, 6127-6145
- Dutton, P.L. (1978) Redox Potentiometry: Determination of Midpoint Potentials of Oxidation-Reduction Components of Biological Electron-Transfer Systems. *Methods. Enzymol.* **54**, 411-435
- Elhai, J. und Wolk, P. (1988) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods. Enzymol.* **167**, 747-754
- 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
- Ferguson, S.J., Jackson, J.B. und McEwan, A.G. (1987) Anaerobic respiration in Rhodospirillaceae. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 117-143
- Friedrich, C.G. (1998) Physiology and genetics of bacterial sulfur oxidation. In: Advances in microbial physiology (Poole, R.K., Hrsg.) pp 236-289. Academic Press, London
- Furne, J., Springfield, J., Koenig, T., DeMaster, E. und Levitt, M.D. (2001) Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochemical Pharmacology* **62**, 255-259
- Ghisla, S. und Massey, V. (1989) Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. *Eur. J. Biochem.* **181**, 1-17
- Giggenbach, W. (1972) Optical Spectra and Equilibrium Distribution of Polysulfide Ions in Aqueous Solution at 20°. *Inorganic Chemistry* **11**, 1201-1207
- Grant, S., Jersee, 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**, 4645-4649
- Griesbeck, C. (1998) Molekularbiologische Untersuchungen an der Sulfid-Chinon Reduktase (SQR). Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenphysiologie, 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 (Pandalai, S.G., Hrsg.) pp 179-203. Research Signpost, Trivandrum, India
- Grieshaber, M.K. und Völkel, S. (1998) Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 33-53
- Guo, L.H., Hill, H.-A.O., Hopper, D.J., Lawrence, G.A. und Sanghera, G.S. (1990) Direct voltammetry of the chromatium-vinosum enzyme sulfide cytochrome *c* oxidoreductase flavocytochrome *c*-552. *J. Biol. Chem.* **265**, 1958-1963
- Häder, D.-P. (1999) Photosynthese. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- 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 Gemerden, H. (1972) Sulfide utilization by purple nonsulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* **86**, 49-56

- Hauska, G., Schütz, M. und Büttner, M. (1996) The Cytochrome *b₆f* Complex - Composition, Structure and Function. In: Advances in Photosynthesis, Vol. 4: Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions (Ort, D.R. und Yokum, C.F., Hrsg.) pp 377-398. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Heelis, P.F. (1991) The Photochemistry of Flavins. In: Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes; Volume I (Müller, F., Hrsg.) pp 171-200. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA
- Hopkins, N. und Williams Jr., C.H. (1995) Charakterization of Lipoamide Dehydrogenase from *Escherichia coli* Lacking the Redox Active Disulfide: C44S and C49S. *Biochemistry* **34**, 11757-11765
- Husain, M. und Massey, V. (1979) Reversible Resolution of Flavoproteins into Apoproteins and Free Flavins. *Methods. Enzymol.* **53**, 429-437
- Irgens, R.L. (1983) Thioacetamide as a source of hydrogen sulfide for colony growth of purple sulfur bacteria. *Curr. Microbiol.* **8**, 183-186
- Jaenicke, R. und Böhm, G. (1998) The stability of proteins in extreme environments. *Current Opinion in Structural Biology* **8**, 738-748
- Jannasch, H.W. (1989) Chemosynthetically sustained ecosystems in the deep sea. In: Autotrophic Bacteria (Schlegel, H.G. und Bowien, B., Hrsg.) pp 147-167. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Karplus, P.A. und Schulz, G.E. (1987) Refined Structure of Glutathione Reductase at 1.54 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **195**, 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
- Klimmek, O., Kröger, A., Steudel, R. und Holdt, G. (1991) Growth of *Wolinella succinogenes* with polysulfide as terminal acceptor of phosphorylative electron transport. *Arch. Microbiol.* **155**, 177-182
- Klughammer, C., Hager, C., Padan, E., Schütz, M., Schreiber, U., Shahak, Y. und Hauska, G. (1995) Reduction of cytochromes with menaquinol and sulfide in membranes from green sulfur bacteria. *Photosyn. Res.* **43**, 27-34
- Knaff, D.B. und Buchanan, B.B. (1975) Cytochrome *b* and photosynthetic sulfur bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **376**, 549-560
- Krauth-Siegel, R.L., Blatterspiel, R., Saleh, M., Schiltz, E., Schirmer, R.H. und Untucht-Grau, R. (1982) Glutathione reductase from human erythrocytes. The sequences of the NADPH domain and of the interface domain. *Eur. J. Biochem.* **12**, 259-267
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Li, R., Bianchet, M.A., Talalay, P. und Amzel, L.M. (1995) The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: Mechanism of the two-electron reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8846-8850
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. und Parker, J. (2001) Brock Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Massey, V. (2000) The Chemical and Biological Versatility of Riboflavin. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 283-296
- Massey, V. und Hemmerich, P. (1980) Active-site probes of flavoproteins. *Biochem. Soc. Trans.* **8**, 246-257
- Mathews, F.S. (1991) New flavoenzymes. *Current Opinion in Structural Biology* **1**, 954-967
- McCormick, D.B. (1977) Interactions of flavins with amino acid residues: assessments from spectral and photochemical studies. *Photochem. Photobiol.* **26**, 169-182

- McEwan, A.G. (1994) Photosynthetic electron transport and anaerobic metabolism in purple non-sulfur phototrophic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **66**, 151-164
- Mederer, N. (2000) Untersuchungen zur Sulfid-Chinon-Reduktase von *Rhodobacter capsulatus*. Zulassungsarbeit Staatsexamen ausgeführt am Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenphysiologie der Universität Regensburg
- Meyer, T.E., Bartsch, R.G., Caffrey, M.S. und Cusanovich, M.A. (1991) Redox Potential of Flavocytochromes *c* from the Phototrophic Bacteria, *Chromatium vinosum* and *Chlorobium thiosulfatophilum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **287**, 128-134
- Meyer, T.E., Bartsch, R.G. und Cusanovich, M.A. (1991) Adduct Formation between Sulfite and Flavin of Phototrophic Bacterial Flavocytochromes *c*. Kinetics of Sequential Bleach, Recolor, and Rebleach of Flavin as a Function of pH. *Biochemistry* **30**, 8840-8845
- Miller, S.M., Massey, V., Ballou, D.P., Williams Jr., C.H., Distefano, M.D., Moore, M. und Walsh, C.T. (1990) Use of a Site-Directed Triple Mutant To Trap Intermediates: Demonstration That the Flavin C(4a)-Thiol Adduct and Reduced Flavin Are Kinetically Competent Intermediates in Mercuric Ion Reductase. *Biochemistry* **29**, 2831-2841
- Miller, S.M., Moore, M., Massey, V., Williams Jr., C.H., Distefano, M.D., Ballou, D.P. und Walsh, C.T. (1989) Evidence for the Participation of Cys₅₅₈ and Cys₅₅₉ at the Active Site of Mercuric Reductase. *Biochemistry* **28**, 1194-1205
- Morton, R.A. (1965) Spectroscopy of quinones and related substances. In: Biochemistry of quinones (Morton, R.A., Hrsg.) pp 23-64. Academic Press, London
- Mozley, D., Remberg, A. und Gärtner, W. (1997) Large-scale generation of affinity-purified recombinant phytochrome chromopeptide. *Photochem. Photobiol.* **66**, 710-715
- Munro, A.W. und Noble, M.A. (1999) Fluorescence Analysis of Flavoproteins. In: Flavoprotein Protocols (Chapman, S.K. und Reid, G.A., Hrsg.) pp 25-47. Humana Press Inc., Totowa
- Müller, F. und Van Berkel, W.J.H. (1991) Methods used to Reversibly Resolve Flavoproteins into the Constituents Apoflavoprotein and Prosthetic Group. In: Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes; Volume I (Müller, F., Hrsg.) pp 261-274. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA
- National Research Council (1979) Hydrogen Sulfide. University Park Press, Baltimore
- Niemz, A. und Rotello, V.M. (1999) From Enzyme to Molecular Device. Exploring the Interdependence of Redox and Molecular Recognition. *Acc. Chem. Res.* **32**, 44-52
- 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**, 233-244
- Pachmayr, F. (1960) Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen in Mineralwasser. Dissertation, Universität München
- Pai, E.F. und Schulz, G.E. (1983) The Catalytic Mechanism of Glutathione Reductase as Derived from X-ray Diffraction Analyses of Reaction Intermediates. *J. Biol. Chem.* **258**, 1752-1757
- Pancoska, P., Bitto, E., Janota, V., Urbanova, M., Gupta, V.P. und Keiderling, T.A. (1995) Comparison of and limits of accuracy for statistical analyses of vibrational and electronic circular dichroism spectra in terms of correlations to and predictions of protein secondary structure. *Protein Science* **4**, 1384-1401
- 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**, 2209-2218
- Prentki, P. und Krisch, H.M. (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**, 303-313
- Rao, N.A., Felton, S.P. und Huennekens, F.M. (1967) Quantitative Determination of Mitochondrial Flavins. *Methods. Enzymol.* **10**, 494-499
- Reinartz, M., Tschaeppe, J., Brueser, T., Trueper, H.G. und Dahl, C. (1998) Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **170**, 59-68

- Rethmeier, J., Rabenstein, A., Langer, M. und Fischer, U. (1997) Detection of traces of oxidized and reduced sulfur compounds in small samples by combination of different high-performance liquid chromatography methods. *J. Chromatogr. A* **760**, 295-302
- Rich, P. und Fisher, N. (1999) Quinone-Binding Sites in Membrane Proteins: Structure, Function and Applied Aspects. *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 561-565
- Rost, B. und Sander, C. (1993) Prediction of Protein Secondary Structure at Better than 70% Accuracy. *J. Mol. Biol.* **232**, 584-599
- Salomon, M., Christie, J.M., Knieb, E., Lempert, U. und Briggs, W.R. (2000) Photochemical and Mutational Analysis of the FMN-Binding Domains of the Plant Blue Light Receptor, Phototropin. *Biochemistry* **39**, 9401-9410
- Schmid, F.X. (1989) Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In: Protein Structure: A practical approach (Creighton, T.E., Hrsg.) pp 251-285. IRL Press, Oxford
- 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., Klughammer, C., Griesbeck, C., Quentmeier, A., Friedrich, C.G. und Hauska, G. (1998) Sulfide-quinone reductase activity in membranes of the chemotrophic bacterium *Paracoccus denitrificans* GB17. *Arch. Microbiol.* **170**, 353-360
- Schütz, M., Maldener, I., Griesbeck, C. und Hauska, G. (1999) Sulfide-Quinone Reductase from *Rhodobacter capsulatus* - Requirement for growth, Periplasmic Localization and Extension of Gene Sequence Analysis. *J. Bacteriol.* **181**, 6516-6523
- Schütz, M., Shahak, Y., Padan, E. und Hauska, G. (1997) Sulfide-quinone reductase from *Rhodobacter capsulatus*: Purification, cloning and expression. *J. Biol. Chem.* **272**, 9890-9894
- Shahak, Y., Arieli, B., Padan, E. und Hauska, G. (1992) Sulfide quinone reductase (SQR) activity in *Chlorobium*. *FEBS Lett.* **299**, 127-130
- 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
- Shahak, Y., Schütz, M., Bronstein, M., Griesbeck, C., Hauska, G. und Padan, E. (1999) Sulfide-dependent anoxygenic photosynthesis in prokaryotes: sulfide-quinone reductase (SQR), the initial step. In: Proceedings of the 9th International Symposium Phototrophic Prokaryotes (Vienna 1997) (Peschek, G.A., Löffelhardt, W. und Schmetterer, G., Hrsg.) pp 217-228. Plenum Press, New York
- Staal, G.E.J., Visser, J. und Veeger, C. (1969) Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **185**, 39-48
- Stankovich, M.T. (1991) Redox Properties of Flavins and Flavoproteins. In: Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes; Volume I (Müller, F., Hrsg.) pp 401-425. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA
- Stetter, K.O. (1996) Hyperthermophilic prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**, 149-158
- Steudel, R. (1996a) Das gelbe Element und seine erstaunliche Vielseitigkeit. *Chemie in unserer Zeit* **30**, 226-234
- Steudel, R. (1996b) Mechanism for the Formation of Elemental Sulfur from Aqueous Sulfide in Chemical and Microbiological Desulfurization Processes. *Ind. Eng. Chem. Res.* **35**, 1417-1423
- Steudel, R., Holdt, G. und Göbel, T. (1989) Ion-pair chromatographic separation of inorganic sulphur anions including polysulphide. *J. Chromatography* **475**, 442-446

- 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**, 60-98
- Tabor, S. und Richardson, C.C. (1985) A bacteriophage T-7 RNA polymerase-promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1074-1078
- Tedeschi, G., Chen, S. und Massey, V. (1995) DT-Diaphorase. Redox Potential, Steady-State, And Rapid Reaction Studies. *J. Biol. Chem.* **270**, 1198-1204
- Thauer, R.K., Jungermann, K. und Decker, K. (1977) Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria. *Bacteriological Reviews* **41**, 100-180
- Tollin, G., Meyer, T.E. und Cusanovich, M.A. (1982) Intramolecular electron transfer in *Chlorobium thiosulfatophilum* flavocytochrome *c*. *Biochemistry* **21**, 3849-3856
- Trudinger, P.A. (1992) Bacterial sulfate reduction: Current status and possible origin. In: Early Organic Evolution (Schidrowski, M., Golubic, S., Kimberley, M.M., McKirdy, D.M., Trudinger, P.A., Hrsg.) pp 367-377. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- 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 Science* **5**, 1753-1764
- Vande Weghe, J.G. und Ow, D.W. (1999) A Fission Yeast Gene for Mitochondrial Sulfide Oxidation. *J. Biol. Chem.* **274**, 13250-13257
- 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
- Von Jagow, G. und Link, T.A. (1986) Use of specific inhibitors on the mitochondrial *bc₁* complex. *Methods. Enzymol.* **126**, 253-271
- Völkel, S. und Grieshaber, M.K. (1996) Mitochondrial sulfide oxidation in *Arenicola marina*. Evidence for alternative electron pathways. *Eur. J. Biochem.* **235**, 231-237
- Weaver, P.F., Wall, J.D. und Gest, H. (1975) Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* **105**, 207-221
- Westphal, A.H. und deKok, A. (1988) Lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. Molecular cloning, organization and sequence analysis of the gene. *Eur. J. Biochem.* **172**, 299-305
- Wijbenga, D.J. und Van Gemerden, H. (1981) The influence of Acetate on the Oxidation of Sulfide by *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* **129**, 115-118
- 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 (Müller, F., Hrsg.) pp 121-211. CRC Press, Boca Raton
- Williams Jr., C.H. (1995) Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *FASEB* **9**, 1267-1276
- Williams Jr., C.H., Arscott, L.D., Müller, S., Lennon, B.W., Ludwig, M.L., Wang, P.-F., Veine, D.M., Becker, K. und Schirmer, R.H. (2000) Thioredoxin reductase. Two models of catalysis have evolved. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6110-6117
- Wilson, D.F. und King, T.E. (1964) The Determination of the Acid-nonextractable Flavin in Mitochondrial Preparations from Heart Muscle. *J. Biol. Chem.* **239**, 2683-2690
- Yong, R. und Searcy, D.G. (2001) Sulfid oxidation coupled to ATP synthesis in chicken liver mitochondria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **129**, 129-137

Veröffentlichungen

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

Veröffentlichungen:

Schütz M., Klughammer C., Griesbeck C., Quentmeier A., Friedrich C.G. und Hauska G. (1998): Sulfide-quinone reductase (SQR) activity in membranes of the chemotrophic bacterium *Paracoccus denitrificans* GB17, *Archives of Microbiology* **170**, 353-360

Schütz M., Maldener I., Griesbeck C. und Hauska G. (1999): Sulfide-Quinone Reductase from *Rhodobacter capsulatus* - Requirement for Growth, Periplasmic Localization and Extension of Gene Sequence Analysis, *Journal of Bacteriology* **181** (20), 6516-6523

Griesbeck C., Hauska G. und Schütz M. (2000): Biological Sulfide Oxidation: Sulfide-Quinone Reductase (SQR), the Primary Reaction, in: Pandalai S.G. (ed): Recent Research Developments in Microbiology, Vol. 4, pp 179-203. Research Signpost, Trivandrum, India

Veröffentlichungen in Vorbereitung:

Griesbeck C., Schödl T., Mederer N., Schütz M. und Hauska G. (2001): Characterization of the heterologously expressed Sulfide-Quinone Reductase (SQR) from *Rhodobacter capsulatus*, in Vorbereitung

Griesbeck C., Schütz M., Bathe S., Gruber L., Vielreicher M. und Hauska G. (2001): Mechanistic studies on Sulfide-Quinone Reductase (SQR) using site-directed mutagenesis, in Vorbereitung

Tagungsberichte:

Schütz M., Griesbeck C., Bronstein M., Maldener I., Shahak Y., Padan E. und Hauska G. (1998): Sulfide-Quinone Reductase (SQR) of *Rhodobacter capsulatus*: expression, induction and inactivation in: Garab G. (ed.) International Congress on Photosynthesis (Budapest, 1998)

Shahak Y., Schütz M., Bronstein M., Griesbeck C., Hauska G. und Padan E. (1999): Sulfide-dependent anoxygenic photosynthesis in prokaryotes: sulfide-quinone reductase (SQR), the initial step, in: Peschek G.A., Löffelhardt W. und Schmetterer G. (eds): Proceedings of the 9th International Symposium Phototrophic Prokaryotes (Vienna, 1997). Plenum Press, New York, pp 217-228

Griesbeck C., Schödl T., Mederer N., Schütz M. und Hauska G. (2000): Die Sulfid-Chinon Reduktase (SQR) phototropher und chemotropher Bakterien. Bioenergetik der Bakterien, Kolloquium in Mauloff/Taunus, 2000

Griesbeck C. und Hauska G. (2001): Sulfide-Quinone Reductase (SQR), a Flavoprotein of the Glutathion Reductase Family. Graduate college „Sensory photoreceptors in natural and artificial systems“, Summer meeting 2001 (Nové Hradky, Tschechische Republik)

Dank

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den drei Jahren der Entstehung dieser Arbeit mit Rat, Tat und Freundschaft begleitet haben.

Herrn Prof. Dr. Günter Hauska möchte ich danken für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, für seine stete Bereitschaft zur Diskussion und für sein Vertrauen, mir die nötige Freiheit und Selbständigkeit in meiner Arbeit zu gewähren.

Dr. Michael Schütz gebührt mein unendlicher Dank, weil er mich in die Geheimnisse der SQR-Forschung eingeführt hat, mir auch nach seinem Ausscheiden aus der Arbeitsgruppe noch stets mit Ratschlägen, Tips und guten Ideen zur Seite gestanden ist und das Manuskript dieser Arbeit kritisch gelesen hat.

Thomas Schödl möchte ich besonders danken für seine Mitarbeit am SQR-Projekt, die auch zur Verbesserung der Expressions- und Reinigungsbedingungen beigetragen hat, seine ständige Hilfsbereitschaft v.a. in Computerfragen und seine Freundschaft.

Nicola Mederer hat im Rahmen ihrer Zulassungsarbeit viele Experimente durchgeführt, die zum besseren Verständnis der SQR beigetragen haben, und hat ihren Humor auch in weniger erfolgreichen Phasen der Arbeit nicht verloren.

Stephan Bathe, Lydia Gruber, Dominik terMeer (der mich durch die Konstruktion seines terMeer-Dumble-SQR-Verstärkers ewig mit der SQR verbinden wird) und Martin Vielreicher waren im Rahmen ihrer Forschungspraktika wertvolle und nette Mitarbeiter bei der Konstruktion und Charakterisierung mutierten SQR-Enzyms. Dafür möchte ich ihnen danken.

Matthias Arnold, Dr. Gabi Fiedler, Alexander Frenzel, Monika Kammerer, Doris Leikam und Dr. Iris Maldener haben mich im Laboralltag mit Rat und Tat stets unterstützt und die nette Atmosphäre der Arbeitsgruppe Hauska mitbegründet.

Klaus Tiefenbach (Arbeitsgruppe Dr. Durchschlag, Lehrstuhl für Physikalische Biochemie, Universität Regensburg) wies mich in die Circular Dichroismus-Spektroskopie ein. Dafür möchte ich mich bedanken.

Hubert Riepl (Lehrstuhl Prof. Dr. Kalbitzer, Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie, Universität Regensburg) sei Dank für die Versuche zur Strukturmodellierung der SQR.

Im Labor von Herrn Prof. Dr. Ulrich Fischer und Dr. Jörg Rethmeier (Abteilung Marine Mikrobiologie, Universität Bremen) durfte ich die Versuche zur Analyse des Schwefelprodukts mittels HPLC durchführen. Bei ihnen möchte ich mich herzlich für Ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. Dr. Achim Kröger (Institut für Mikrobiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main) und Herrn Prof. Dr. Ralf Steudel (Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Technische Universität Berlin) möchte ich danken für ihre Diskussionsbereitschaft via Email und ihre Anmerkungen über die Chemie des Polysulfids und Schwefels.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Jörg Daub, Christian Trieflinger, Dr. Shen Zhen und Roman Prochazka (Institut für Organische Chemie, Universität Regensburg) dafür, daß sie sich Zeit genommen haben, mit mir über die Flavinchemie zu diskutieren.

Dr. Yosepha Shahak (Institute of Horticulture, The Volcani Center, Bet-Dagan, Israel) und Dr. Michal Bronstein (Institute of Life Sciences, Hebrew University of Jerusalem, Israel) durfte ich als engagierte und diskussionsbereite SQR-Forscherinnen während ihres Aufenthalts in unserem Labor kennenlernen.

Danken möchte ich meinen Eltern, weil sie mich immer unterstützt haben und weil ohne sie diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Und ich danke Tina, weil...