

# **Untersuchungen des aeroben Schwefelstoffwechsels von *Acidianus ambivalens***

Vom Fachbereich Biologie der  
Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines *Doctor rerum naturalium*  
genehmigte

## **Dissertation**

von

**Fabian Müller**

aus Langen

Dipl.-Biol.

Berichterstatter:	(1. Referent):	Dr. habil. Arnulf Kletzin
Mitberichterstatterin:	(2. Referentin):	Prof. Dr. Felicitas Pfeifer
Tag der Einreichung:		14.04.2008
Tag der mündlichen Prüfung:		10.06.2008

Darmstadt, 2008

**D 17**

„Zwei mal zwei ist vier. Es hat sich nichts geändert.“

*Günter Müller, 2007*

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>9</b>
2.1 Archaea .....	9
2.2 <i>Acidianus ambivalens</i> .....	9
2.3 Schwefel .....	11
2.4 Prokaryotische Schwefeloxidation, insbesondere bei Bakterien .....	11
2.5 Schwefeloxidation der Archaea, insbesondere bei <i>A. ambivalens</i> .....	14
2.6 Enzymatische Thiosulfatoxidation .....	16
2.7 Tetrathionat-Hydrolasen .....	17
2.8 Enzymatische Sulfidoxidation .....	18
2.9 Ziel der Arbeit .....	20
<b>3. Materialien und Methoden .....</b>	<b>21</b>
3.1 Materialien, Chemikalien und Enzyme .....	21
3.2 Organismen und Wachstumsbedingungen .....	21
3.2.1 Ansetzen einer <i>A. ambivalens</i> Kultur und Zellernte .....	22
3.3 Proteinreinigung aus <i>Acidianus ambivalens</i> .....	23
3.3.1 Zellaufschluß, Präparation der löslichen und der Membranfraktion, sowie Solubilisierung der Membranproteine .....	23
3.3.2 Säulenchromatographie .....	24
3.3.2.1 Reinigungsversuche einer Tetrathionat-Hydrolase .....	25
3.3.2.2 Reinigungsversuch einer Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase (SQO) .....	26
3.3.3 Solubilisierung der TTH durch Spheroplastierung .....	27
3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	28
3.5 SDS-PAGE Analyse .....	28
3.5.1 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure .....	29
3.6 <i>Semidry</i> Blot für Proteine .....	29
3.7 N-terminale Sequenzierung .....	30
3.8 MALDI-TOF Analyse .....	30
3.9 Chinon Extraktion .....	30
3.10 Messungen der Absorptionsspektren .....	30
3.11 Fluoreszenz Spektroskopie .....	31
3.12 Circular dichroismus-Spektroskopie .....	31
3.13 Metallgehaltsbestimmung durch TXRF Analyse .....	32
3.14 Massenspektrometrie .....	32

3.15 Nachweis einer Glycosylierung durch Alcianblau Färbung .....	32
3.16 Deglycosylierung der TQO.....	33
3.16.1 Enzymatische Deglycosylierung .....	33
3.16.2 Chemische Deglycosylierung.....	33
3.17 Aktivitätstests .....	34
3.17.1 TQO-Aktivitätsmessung mit Kaliumhexacyanoferrat(III) .....	34
3.17.2 TQO-Aktivitätsmessung mit Decylubichinon.....	34
3.17.3 TQO-Aktivitätsmessung mit Cytochrom c.....	35
3.17.4 SQO-Aktivitätsmessung mit Decylubichinon.....	35
3.17.5 Messung der TTH-Aktivität .....	35
3.17.5.1 Cyanolyse: Tetrathionat- und Thiosulfatnachweis .....	35
3.17.5.2 Aktivitätstest .....	37
3.17.5.3 Wirkungstest verschiedener Substanzen auf die TTH-Aktivität.....	38
3.17.6 NADH-DH Aktivitätsmessung mit Kaliumhexacyanoferrat(III) .....	38
3.17.7 Schwefel-Oxygenase/-Reduktase (SOR) .....	39
3.17.8 Pyrophosphatase-Aktivitätstest.....	39
3.17.9 Aktivitätsmessungen mit einer Sauerstoffelektrode .....	40
3.18 Biochemische Charakterisierungen .....	41
3.18.1 Temperaturabhängigkeit der TQO .....	41
3.18.2 Bestimmungen der TQO $K_M$ -Werte für DQ und $K_3Fe(CN)_6$ .....	41
3.18.3 Temperatur- und pH-Abhängigkeit der TTH .....	41
3.18.4 Bestimmung der kinetischen Konstanten der TTH .....	42
3.18.5 Bestimmung der kinetischen Konstanten der $S^2$ -abhängigen Sauerstoffreduktion durch die Membran.....	42
3.19 DNA und RNA Analysen .....	42
3.19.1 Southern-Analyse .....	42
3.19.2 Northern-Analyse .....	43
3.19.2.1 Isolierung von RNA .....	43
3.19.2.2 Northern-Blot.....	44
3.20 Sequenzanalysen von DoxD und DoxA bzw. <i>doxD und doxA</i> .....	45
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
4.1 Thiosulfat-Chinon-Oxidoreduktase (TQO) .....	46
4.1.1 Aktivität der TQO mit DQ, $K_3Fe(CN)_6$ und Cyt c .....	46
4.1.2 Temperatur- und pH-Abhängigkeit der TQO.....	48
4.1.3 $K_M$ -Werte für die TQO Elektronenakzeptoren DQ und $K_3Fe(CN)_6$ , sowie das Substrat TS.....	48
4.1.4 Kopplung der Thiosulfatoxidation mit der Sauerstoffreduktion .....	48
4.1.5 Fluoreszenz Spektroskopie.....	49
4.1.6 Massenspektren der Chinonextrakte von TQO-Reinigungsfractionen.....	50
4.1.7 Chinongehalt der TQO.....	51
4.1.8 Metallgehaltsbestimmung der TQO durch TXRF Analyse .....	51

---

4.1.9 Identifizierung der Untereinheiten der TQO .....	51
4.1.10 Sekundärstrukturanalyse der TQO durch CD-Spektroskopie .....	52
4.1.11 Nachweis einer Glycosylierung durch Färbung der TQO mit Alcianblau .....	53
4.1.12 Deglycosylierung der TQO.....	54
4.1.13 Sequenzanalysen von DoxD und DoxA bzw. <i>doxD und doxA</i> .....	55
4.1.14 Kopienzahl des <i>doxDA</i> -Operons im Genom von <i>Acidianus ambivalens</i> .....	58
4.1.15 Nachweis der <i>doxDA</i> -mRNA durch Northern-Analyse.....	60
4.2 Tetrathionat-Hydrolase (TTH) .....	61
4.2.1 Säulenchromatographische Reinigungsversuche einer TTH.....	61
4.2.1.1 Erster Reinigungsversuch .....	61
4.2.1.2 Zweiter Reinigungsversuch.....	65
4.2.2 Messung der Pyrophosphatase-Aktivität .....	69
4.2.3 Solubilisierung der TTH durch Spheroplastierung .....	69
4.2.4 Absorptionsspektren von TTH-Reinigungsfractionen und von PQQ.....	71
4.2.5 Biochemische Charakterisierung der TTH.....	71
4.2.5.1 Messung der TTH-Aktivität.....	71
4.2.5.1.1 Cyanolyse: Tetrathionat-/Thiosulfat-Standardreihen .....	71
4.2.5.1.2 Aktivitätstest .....	73
4.2.5.1.3 Wirkungstest verschiedener Substanzen auf die Aktivität der TTH.....	76
4.2.5.2 Temperatur- und pH-Abhängigkeit der TTH .....	76
4.2.5.3 Bestimmung der kinetischen Konstanten der TTH .....	78
4.3 Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase .....	78
4.3.1 Säulenchromatographische Reinigung .....	78
4.3.2 SQO-Aktivitätsmessung mit Decylubichinon.....	83
4.3.3 Na <sub>2</sub> S-abhängige Sauerstoffreduktionsaktivität der Membranfraktion (MF).....	85
4.3.3.1 Inhibitionsversuche mit KCN, HQNO und Stigmatellin .....	87
4.3.3.2 Na <sub>2</sub> S-abhängige Sauerstoffreduktionsaktivität von gereinigter terminaler Oxidase von <i>A. ambivalens</i> alleine und zusammen mit der MF .....	89
4.3.3.3 Bestimmung der kinetischen Konstanten der Na <sub>2</sub> S-abhängigen Sauerstoffreduktion durch die MF.....	91
4.3.3.4 Sauerstoffverbrauchsmessungen mit Sulfit und TT .....	91
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>92</b>
5.1 Thiosulfat-Chinon-Oxidoreduktase .....	92
5.1.1 Lokalisierung und Reinigung der TQO.....	92
5.1.2 Untereinheiten der TQO.....	93
5.1.3 Cofaktoren der TQO .....	94
5.1.4 Aktivität der TQO .....	95
5.1.5 Inhibition der TQO .....	96
5.1.6 pH- und Temperaturabhängigkeit der TQO .....	97
5.1.7 Sekundärstrukturanalyse der TQO .....	97
5.1.8 Revision des Modells der Chinol-Sauerstoff-Oxidoreduktase.....	98
5.1.9 Eine neue Enzymfamilie von membrangebundenen Oxidoreduktasen .....	99

---

5.1.10 Kopplung der Oxidation von Schwefelverbindungen mit der Sauerstoff- reduktion .....	101
5.2 Tetrathionat-Hydrolase .....	102
5.2.1 Reinigung der TTH.....	102
5.2.2 Mögliche Reaktion, Aktivität und Lokalisation der TTH.....	103
5.2.3 Möglicher Cofaktor der TTH.....	105
5.2.4 Regulation der TTH-Synthese .....	106
5.2.5 Wird die TTH auch in anderen Sulfolobales synthetisiert? .....	106
5.3 Sulfid-oxidierende Aktivitäten in <i>A. ambivalens</i> .....	106
5.3.1 Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase .....	107
5.3.1.1 Lokalisation und Reinigung der SQO .....	107
5.3.1.2 Aktivität der SQO.....	108
5.3.2 Sulfid-oxidierende Aktivität der Membran .....	108
5.3.2.1 Biochemische Charakterisierung .....	108
5.3.2.2 Inhibition .....	109
5.3.2.3 Kopplung der Oxidation von Schwefelverbindungen mit der Sauerstoffreduktion.....	110
5.4 Hypothetisches Modell des Schwefelstoffwechsels .....	110
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>113</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>124</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>126</b>
8.1 Lebenslauf .....	126
8.2 Erklärungen .....	127
8.3 Danksagung.....	128

## 1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwefelstoffwechsel von aerob gewachsenen Zellen des extrem thermo- und acidophilen Archaeons *Acidianus ambivalens* untersucht. Zur Energiekonservierung oxidiert *A. ambivalens* elementaren Schwefel ( $S^0$ ) oder Tetrathionat (TT) über verschiedene Zwischenprodukte zur Schwefelsäure. Beim Wachstum mit  $S^0$  wird dieser im ersten Schritt durch die cytoplasmatische Schwefel-Oxygenase/-Reduktase (SOR) sauerstoffabhängig zu Sulfid und Sulfit disproportioniert, während Thiosulfat (TS) zusätzlich nicht-enzymatisch gebildet wird. In dieser Arbeit werden einige Enzyme beschrieben, die Sulfid, TS und TT weiter umsetzen.

Die membranständige Thiosulfat-Chinon-Oxidoreduktase (TQO) oxidierte TS zu TT mit den nicht-nativen Elektronenakzeptoren Decylubichinon (DQ) oder Kaliumhexacyanoferrat ( $K_3Fe(CN)_6$ ). Die spezifische Aktivität mit DQ betrug  $2,4 \pm 0,08$  U (mg Protein)<sup>-1</sup> bei 80°C und mit  $K_3Fe(CN)_6$  maximal 73 U (mg TQO)<sup>-1</sup> bei 92°C. Die Aktivierungsenergie lag bei 37,7 kJ mol<sup>-1</sup>. Die  $K_M$ -Werte betragen 2,6 mM für TS, 5,87 µM für DQ und 3,4 mM für  $K_3Fe(CN)_6$ . Aufgrund des Elektronenakzeptors Chinon repräsentierte die TQO das erste Enzym einer neuen EC Klasse mit der Nummer 1.8.5.2. Fluoreszenzemissions- und Massenspektren zeigten, dass *Caldariella* Chinon, Menachinon und *Sulfolobus* Chinon an die TQO gebunden waren. Andere Cofaktoren wurden nicht gefunden. CD-Spektroskopie (Circular-dichroismus) ergab einen durchschnittlichen Gehalt der  $\alpha$ -Helices von 46 (+/- 2)% und der  $\beta$ -Faltblätter von 11,6 (+/- 0,6)% für das Holoenzym. Die TQO - ein Heterotetramer ( $\alpha_2\beta_2$ ) mit einer molekularen Masse von 102 kDa - war aus zwei Untereinheiten mit den apparenten molekularen Massen von 16 und 28 kDa aufgebaut. Die größere Untereinheit war glycosyliert und identisch zu DoxA und die kleinere identisch zu DoxD. Beide Untereinheiten wurden zuvor als Teil des terminalen Chinol:Sauerstoff-Oxidoreduktase (Oxidase) Komplexes charakterisiert. In anaerob kultivierten *A. ambivalens* Zellen wurde weder durch Northern-Analyse *doxDA*-mRNA nachgewiesen noch TQO-Aktivität gemessen. Ein Sequenzvergleich der kombinierten DoxD und DoxA Aminosäuresequenzen ergab, dass verschiedene Homologe in anderen *Sulfolobales*, sowie in drei *Bacteroides* Stämmen und in dem acidophilen, Schwefel-oxidierenden Bakterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* vorlagen.

In aerob mit TT kultivierten Zellen wurde eine Tetrathionat-Hydrolase (TTH) Aktivität gemessen, deren Produkt unter anderen TS war. Die spezifische TTH-Aktivität der löslichen Fraktion betrug  $44 \text{ mU (mg Protein)}^{-1}$  und stellte das 63-fache der spezifischen Aktivität der entsprechenden Fraktion von mit  $S^0$  kultivierten Zellen dar. In zwei Reinigungsversuchen jeweils aus der löslichen Fraktion von mit TT kultivierten Zellen wurde die TTH um das 66- bzw. 89-fache mit einer spezifischen Aktivität von 2,9 bzw. 3,9 U (mg Protein) $^{-1}$  angereichert. Trotzdem waren jeweils kontaminierende Proteine in erheblicher Anzahl vorhanden. Der  $K_M$ -Wert betrug 1,3 mM TT und die maximale Geschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) 55 mU. Das pH-Optimum lag bei pH 1 und die Aktivität erhöhte sich jeweils mit steigender Temperatur bis zu 95°C. Die Aktivierungsenergie lag bei  $29 \text{ kJ mol}^{-1}$ . PQQ (Pyrrolochinolin-Chinon) erhöhte die TTH-Aktivität um das dreifache, was darauf hindeutete, dass PQQ ein Cofaktor der TTH sein könnte. Eine 27-fach höhere spezifische TTH-Aktivität wurde bei der Solubilisierung der TTH durch Spheroplastierung mit 10 mM EDTA als nach einem kompletten Zellaufschluss erhalten. Dies deutete darauf hin, dass die TTH extrazellulär im Pseudoperiplasma vorlag.

Eine spezifische Sulfid-oxidierende Aktivität mit DQ als Elektronenakzeptor (SQO) von  $0,32 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$  wurde in der Membran- aber nicht in der löslichen Fraktion von aerob mit  $S^0$  kultivierten *A. ambivalens* Zellen gemessen. Die SQO wurde aus dem Membransolubilisat um das 9-fache zu einer spezifischen Aktivität von  $4,9 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$  säulenchromatographisch angereichert. Das Enzym war aber nicht rein und enthielt viele andere Proteine, so dass es nicht identifiziert werden konnte.

Mit einer Sauerstoffelektrode wurden ein TS- und ein  $S^{2-}$ -abhängiger Sauerstoffverbrauch jeweils durch die intakte Membran nachgewiesen, deren Aktivität jeweils sensitiv gegenüber Cyanid war. Die spezifische Aktivität betrug 6,8 bzw.  $52 \pm 5 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ (mg Gesamtprotein)}^{-1}$ . Der  $S^{2-}$ -abhängige Sauerstoffverbrauch folgte der Michaelis-Menten Kinetik mit einem  $K_M$ -Wert von 0,13 mM  $\text{Na}_2\text{S}$ , einem  $V_{\max}$  von  $72,5 \text{ nmol O}_2 \text{ (min mg Protein)}^{-1}$  und wurde durch die SQO-inhibierenden Chinonanaloga HQNO (Heptylhydroxyquinoline-N-oxide) und Stigmatellin inhibiert. Diese Ergebnisse wurden so interpretiert, dass jeweils in der Membran ein Elektronentransport von TS bzw.  $S^{2-}$ , katalysiert durch die TQO bzw. SQO, auf die terminale Oxidase stattfindet. In ihrer Gesamtheit belegten die Resultate, dass *A. ambivalens* zur Energiegewinnung Elektronen aus der Oxidation der Schwefelverbindungen in die Atmungskette einbringt.



## 2. Einleitung

„Schwefel ist einer der interessantesten aber auch am schwersten zu untersuchenden Elemente“ (Steudel, 2000). Die dissimilatorische Umsetzung anorganischer Schwefelverbindungen gehört zu den wichtigsten Prozessen des globalen Schwefelkreislaufs. So bilden schwefelumsetzende Prozesse durch lithoautotrophe Mikroorganismen in heißen Quellen die Grundlagen der Nahrungskette in diesen lichtunabhängigen Ökosystemen, da sie Energie für die CO<sub>2</sub>-Fixierung liefern (Seegerer *et al.*, 1993). Einer der Modellorganismen zur Untersuchung der dabei zugrunde liegenden Stoffwechselprozesse ist das Archaeon *Acidianus ambivalens*, dessen Energiestoffwechsel auf enzymatischer Ebene bereits teilweise charakterisiert ist. In der hier vorgelegten Arbeit wurde der Schwefelstoffwechsel von aerob gewachsenem *A. ambivalens* untersucht.

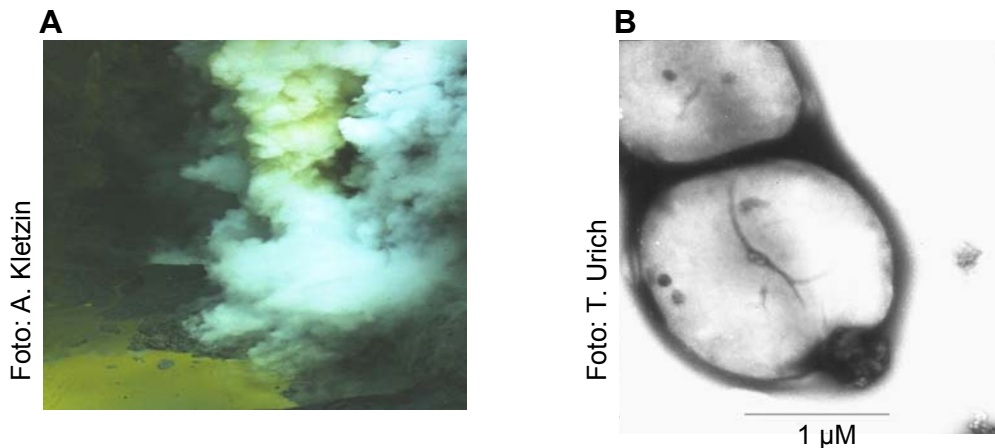
### 2.1 Archaea

Die Archaea stellen neben den Bacteria und Eukarya die dritte Domäne des Lebens dar (Woese *et al.*, 1990; Woese, 2000, 2002) und sind in die vier Reiche Euryarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota und Nanoarchaeota unterteilt (Barns *et al.*, 1996; Reysenbach *et al.*, 2000; Huber *et al.*, 2002). Viele Archaea besiedeln extreme Standorte, wie heiße Quellen, Salzseen, Vulkane oder Eis. *A. ambivalens* gehört zum Reich der Crenarchaeota in die Ordnung der Sulfolobales, zu der unter anderem die Gattungen *Acidianus*, *Metallosphaera*, *Sulfolobus* und *Sulfurisphaera* zählen (Seegerer & Stetter, 1992). Die Sulfolobales sind überwiegend acidophile (Opt. pH 2,5-3,5) und wie die meisten kultivierten Crenarchaeota hyperthermophile Organismen (Opt. 80-110°C), die in neutralen bis sauren, vulkanischen Biotopen leben (Abb. 1 A; Seegerer *et al.*, 1993; Stetter, 2006a, b; Kletzin *et al.*, 2004). Viele nicht kultivierte Crenarchaeota sind jedoch auch kälteliebend, z.B. aus nährstoffarmen Meeren, die hier nicht näher beschrieben werden (DeLong *et al.*, 1992; Hallam *et al.*, 2006).

### 2.2 *Acidianus ambivalens*

*Acidianus ambivalens* (DSMZ 3772) wurde aus Solfataren Islands isoliert und ist ein extrem thermo- und acidophiles Archaeon, das bei einer Temperatur im Bereich von 60 bis 90°C mit einem Optimum bei 80°C und einem pH-Wert im Bereich von 1 bis 4 mit einem Optimum bei pH 2,5 wächst (Zillig *et al.*, 1985; Zillig *et al.*, 1986; Fuchs *et*

*al.*, 1996). Als fakultativ anaerober, chemolithoautotropher Organismus ist *A. ambivalens* in der Lage, zur Energiegewinnung elementaren Schwefel mit Sauerstoff zu oxidieren oder mit Wasserstoff zu reduzieren und mit CO<sub>2</sub> als Kohlenstoffquelle zu wachsen (Zillig *et al.*, 1985, 1986; Laska, 2000, Laska *et al.*, 2003). Unter aeroben Bedingungen kann auch Tetrathionat als alleinige Energiequelle genutzt werden (Lauber, 2006).



**Abb. 1:** **A)** Fumarole auf White Island vor der Küste Neuseelands. **B)** Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Acidianus ambivalens*.

Phänotypisch sind einzelne Zellen durch eine unregelmäßige, kokkoide Zellform mit einem Durchmesser von 0,8-2,0 μm geprägt (Abb. 1 B). Die Membran besteht aus Phytanyletherlipiden, die überwiegend in Form von Tetraetherlipiden vorkommen (Trincone *et al.*, 1989). Bei Wachstum unter aeroben Bedingungen sind die wichtigsten Chinone Caldariella Chinon und Sulfolobus Chinon (Abb. 4; Thurl *et al.*, 1986). Der Membran liegt direkt eine Schicht von glycosylierten S-Layer („Surface Layer“) Proteinen auf, die eine Zellhülle in einer trigonal- oder hexagonal-symmetrischen Gitterstruktur und so ein „Pseudoperiplasma“ ausbilden (Eichler, 2003; Claus *et al.*, 2005; Veith, 2006; Engelhardt, 2007; Veith, unveröffentlicht).

Der Organismus wurde zuerst *Sulfolobus ambivalens* genannt und kurz darauf zu *Desulfurolobus ambivalens* umbenannt (Zillig *et al.*, 1985, 1986). Phylogenetische Analysen basierend auf der 16S rRNA zeigten allerdings eine nahe Verwandtschaft von *Desulfurolobus ambivalens* zu *Acidianus infernus* mit einer phylogenetischen Distanz von nur 0,7%, was auf eine gemeinschaftliche Abstammung hindeutete. Diese Beobachtungen zusammen mit anderen physiologischen und biochemischen Ähnlichkeiten führten zu einer Änderung des Gattungsnamens zu *Acidianus* (Fuchs *et al.*, 1996). *A. ambivalens* enthält ein Plasmid pDL10, welches während des

anaeroben Wachstums amplifiziert wird (Zillig *et al.*, 1985, 1986). Interessanterweise liegt der G/C-Gehalt der genomischen DNA trotz des hyperthermophilen Habitus in einem niedrigen Bereich bei 32,7% nahe bei dem von *A. brierleyi* (31,5%) und unterhalb der Werte von anderen *Sulfolobus* Spezies (38%) (Zillig *et al.*, 1985, 1986; Fuchs *et al.*, 1996).

### 2.3 Schwefel

Schwefel ( $S^0$ ) ist zu etwa 0,048% in der festen Erdkruste zumeist in Verbindungen mit Metallen, wie Pyrit ( $FeS_2$ ), Arsenpyrit ( $FeAsS$ ), Kupferkies ( $CuFeS_2$ ), Bleiglanz ( $PbS$ ), Zinkblende ( $ZnS$ ), Gips ( $CaSO_4 \times 2 H_2O$ ), Bittersalz ( $MgSO_4 \times 7 H_2O$ ) und Glaubersalz ( $Na_2SO_4 \times 10 H_2O$ ) enthalten (Mortimer, 1996).

Elementarschwefel kann in unterschiedlichen Molekülgrößen – von  $S_2$  über  $S_6$ ,  $S_7$ ,  $S_8$  bis hin zu Makromolekülen ( $S^\infty$ ) – auftreten. In den meisten Umgebungen ist er auch in Anwesenheit von Sauerstoff stabil und liegt in reiner Form bis  $96^\circ C$  in gelben rhombischen Kristallen ( $\alpha$ -Schwefel) als  $S_8$ -Ring vor (Schwefelblume; Steudel, 2000). Diese  $S_8$ -Ringe entstehen durch kovalente Einfachbindungen zwischen acht Schwefelatomen. In Wasser ist Schwefel so gut wie unlöslich ( $5 \mu g/l$ , Boulège, 1978). Obwohl Mikroorganismen Schwefel vor der Oxidation aktivieren müssen, um ihn verfügbar zu machen, kann er leicht von Schwefel oxidierenden Bakterien zu Sulfat oxidiert werden (Rohwerder & Sand, 2003; Kletz *et al.*, 2004). Diese Aktivierung erfolgt z.B. durch nucleophilen Angriff der Thiolgruppe von Cysteinresten in Proteinen, wobei lineare Polysulfane oder bei einer Reduktion wasserlösliche Polysulfide entstehen (Iciek & Wlodek, 2001). Sulfanschwefelverbindungen enthalten labile, hoch reaktive Schwefelatome in einem reduzierten Oxidationszustand mit einer Valenz von 0 oder -1, welche kovalent an ein anderes Schwefelatom gebunden sind (Iciek & Wlodek, 2001). Sie tendieren dazu, unverzweigte Ketten auszubilden. Schwefelatome können in jeder Oxidationsstufe von -2 bis +6 auftreten. Diese hohe chemische Reaktivität des Schwefels erschwert die Untersuchungen des Metabolismus von anorganischen Schwefelverbindungen sehr (Suzuki, 1999).

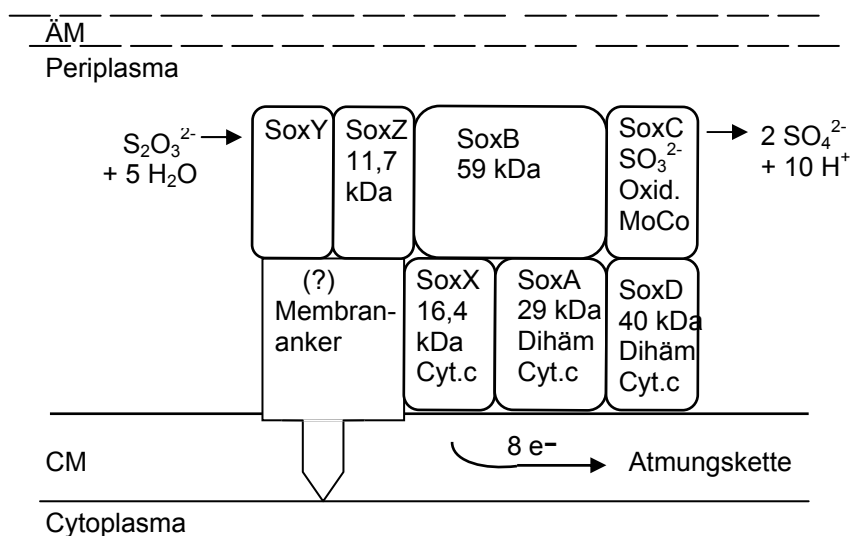
### 2.4 Prokaryotische Schwefeloxidation, insbesondere bei Bakterien

Die Oxidation von Schwefelwasserstoff und Schwefel im Boden und Wasser ist eine der wichtigsten Energie liefernden Reaktionen in aeroben vulkanischen und anderen extremen Ökosystemen (Friedrich *et al.*, 2005). Sie wird sowohl von Archaeen als

auch von Bakterien durchgeführt (Kletzin *et al.*, 2004; Friedrich *et al.*, 2001). Diese chemotrophen Mikroorganismen können die Elektronen aus der Oxidation des Schwefels zur Energiegewinnung über die Atmungskette und die autotrophen Mikroorganismen auch zur Reduktion von Kohlenstoffdioxid nutzen (Kletzin *et al.*, 2004; Friedrich *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 1997; Tabita *et al.*, 2005; Brune, 1995; Hügler *et al.*, 2003, Berg *et al.*, 2007). Schwefel oxidierende Bakterien können alkali-, neutro- oder acidophil sein (Sorokin *et al.*, 2003; Banciu *et al.*, 2004; Friedrich *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 1997; Brune, 1995). Sie sind phylogenetisch und physiologisch divers (Friedrich, 1998; Friedrich *et al.*, 2005). Hierzu gehören aerobe chemotrophe Bakterien wie *Acidithiobacillus*, *Aquifex*, *Bacillus*, *Beggiatoa*, *Paracoccus*, *Pseudomonas* und *Thiobacillus* (Friedrich *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 1997) und anaerobe phototrophe wie *Allochromatium*, *Chlorobium*, *Rhodobacter* und *Rhodospseudomonas*. Diese phototrophen Organismen nutzen reduzierte Schwefelverbindungen als Elektronendonator für die anoxygene Photosynthese (Tabita *et al.*, 2005; Brune, 1995).

Untersuchungen der enzymatischen Schwefeloxidation zeigten unterschiedliche Reaktionswege. Die Charakterisierung des Schwefel oxidierenden Enzymsystems (Sox) des Alphaproteobakteriums *Paracoccus pantotrophus* und die Identifizierung entsprechender Gene in den Genomen von anderen chemotrophen oder phototrophen Bakterien führte zu der Frage, ob es einen gemeinsamen Mechanismus der Schwefeloxidation in Bakterien gibt, und ob sich dieser von den Schwefel oxidierenden Proteinen der Archaeae unterscheidet (Rother *et al.* 2001; Friedrich *et al.*, 2001, 2005). Der im Periplasma lokalisierte, membrangebundene Sox-Multienzymkomplex oxidiert Schwefelwasserstoff, Schwefel, Sulfid und Thiosulfat (TS) in einer sauerstoffunabhängigen Reaktion *in vitro* zu Sulfat, wobei Cytochrom *c* reduziert wird (Abb. 2, Friedrich *et al.*, 2000, 2001; Rother *et al.*, 2001). Er besteht aus den Proteinen SoxXA, SoxYZ, SoxB und SoxCD, wobei jedes der Proteine alleine katalytisch inaktiv ist (Abb. 2, Friedrich *et al.*, 2000; Rother *et al.*, 2001). Die am besten untersuchte Reaktion des Komplexes ist die Oxidation von TS, die vollständig enzymgebunden ohne freiwerdende Zwischenprodukte abläuft (Friedrich *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 1982, 1988, 1997; Brüser *et al.*, 2000). Hierbei katalysiert SoxAX die oxidative und kovalente Übertragung von TS auf das Substrattransportprotein SoxYZ (Friedrich *et al.*, 2001). Die Sulfonschwefelgruppe wird dann durch die Sulfatthiohydrolase SoxB abgespalten, wobei ein

Cysteinpersulfid und ein Sulfat erhalten werden. Anschließend wird die an SoxYZ verbleibende Sulfangruppe durch die Schwefel-Dehydrogenase SoxC des  $\alpha_2\beta_2$  Heterotetramers SoxCD zum Sulfon oxidiert, welches wiederum durch SoxB hydrolysiert wird. Die einen Molybdäncofaktor enthaltende Untereinheit SoxC (43,9 kDa) weist signifikante Ähnlichkeiten zu Sulfitoxidasen auf und ist fest mit SoxD assoziiert (Friedrich *et al.*, 1994; Rother *et al.*, 2001). Das monomere SoxB Protein enthält zwei Atome Mangan, während das heterodimere SoxYZ keine Cofaktoren aufweist, welches Thiosulfat kovalent an einem Cysteinrest am C-Terminus von SoxY bindet (Quentmeier *et al.*, 2001).



**Abb. 2:** Sox Multienzymkomplex von *Paracoccus pantotrophus* (nach Friedrich *et al.*, 2000; aus Kappler *et al.*, 2001). CM= Cytoplasmamembran, ÄM = äußere Membran, 8 e<sup>-</sup> = 8 Elektronen, Cyt. c = Cytochrom c, MoCo= Molybdopterincofaktor.

Die grundlegenden Sox-Gene (*soxXABYZ*) wurden auch in den anaeroben phototrophen Schwefelbakterien *Chlorobium tepidum* und *Allochrochromatium vinosum* gefunden und sind essentiell für die Schwefeloxidation in *C. tepidum* (Hanson & Tabita, 2003; Eisen *et al.*, 2002; Friedrich *et al.*, 2005). Vermutlich ermöglichen diese in Kombination mit dem *dsr*-Gencluster, welcher neben anderen Proteinen eine dissimilatorische *Sirohaem*-Sulfitreduktase codiert, die Oxidation von Thiosulfat und Sulfid zu Sulfat (Pott & Dahl, 1998; Dahl *et al.*, 2005; Friedrich *et al.*, 2005).

Neben dem Sox-Komplex abhängigen Reaktionsweg, der eine zentrale Rolle in mesophilen bei neutralem pH-Wert wachsenden Bakterien einnimmt, gibt es einen weiteren als „S<sub>4</sub>-Zwischenprodukt“ bezeichneten Schwefeloxidationsweg, der in mesoacidophilen, also bei saurem pH (1 bis 3) wachsenden Bakterien wie

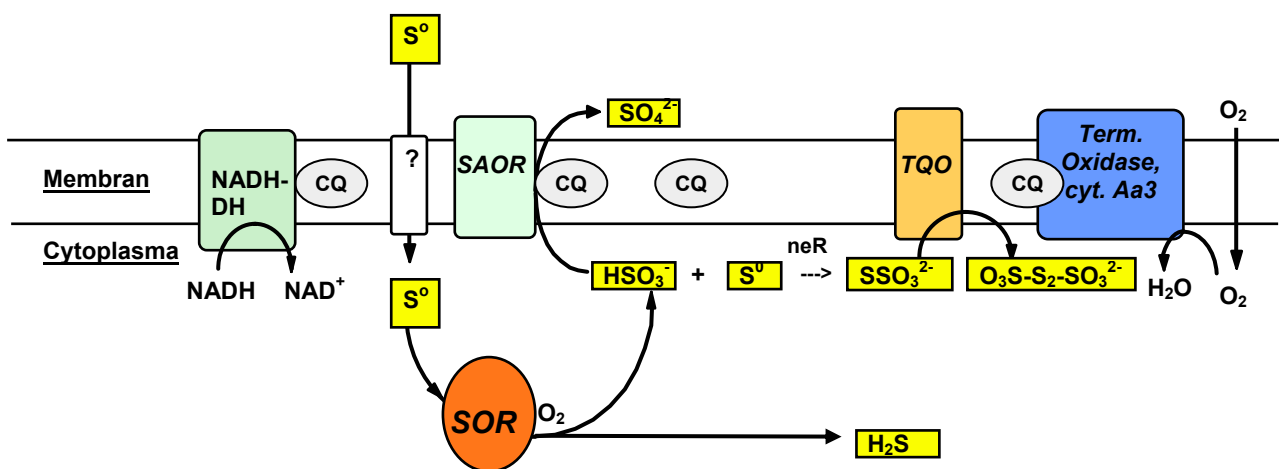
*Acidithiobacillus* und *Acidiphilum* vorkommt (Trudinger, 1961; Kelly, 1988; Meulenberg *et al.*, 1993; Kelly *et al.*, 1997; Brüser *et al.*, 2000; Friedrich *et al.*, 2001). Hierbei wird TS zu dem stabilen Zwischenprodukt Tetrathionat (TT) – namensgebend für diesen Weg – oxidiert, welches anschließend durch die TT-Hydrolase, einem Schlüsselenzym in diesem Reaktionsweg, umgesetzt wird (Brüser *et al.*, 2000). Zusätzlich wurde ein weiteres Modell für acidophile Bakterien ohne TT als Zwischenprodukt vorgeschlagen, wobei elementarer Schwefel zuerst durch eine periplasmatische sauerstoff- und glutathionabhängige Schwefel-Dioxygenase zu Sulfid oxidiert wird, welches dann im zweiten Schritt durch eine Sulfid:Akzeptor-Oxidoreduktase weiter zu Sulfat umgesetzt wird (Suzuki, 1965 a, b; Suzuki & Silver, 1966; Rohwerder & Sand, 2003; Rother *et al.*, 2001). Obwohl viele Schwefelverbindungen oxidierende Enzyme charakterisiert wurden, gibt es im Gegensatz zum Sox-Reaktionsweg vom „S<sub>4</sub>-Zwischenprodukt“ Weg noch kein klares und eindeutiges Modell.

## 2.5 Schwefeloxidation der Archaea, insbesondere bei *A. ambivalens*

Aerobe Schwefeloxidation der Archaeae ist überwiegend bei Mitgliedern der thermoacidophilen Sulfolobales zu finden (Stetter *et al.*, 1990; Fuchs *et al.*, 1996; Friedrich *et al.*, 2001, 2005). Sie ist in *Acidianus ambivalens* am besten untersucht. *A. ambivalens* oxidiert elementaren Schwefel über verschiedene Zwischenprodukte zu Sulfat (Abb. 3; Zillig *et al.*, 1986). Das Eingangsenzym des aeroben Schwefelstoffwechsels ist die im Cytoplasma lokalisierte Schwefel-Oxygenase/-Reduktase (SOR), die sauerstoffabhängig die Disproportionierung von Schwefel zu Sulfid und Sulfid katalysiert (Abb. 3; Kletzin, 1989). Thiosulfat (TS) wird in einer nicht-enzymatischen Reaktion aus Schwefel und Sulfid gebildet (Abb. 3; Kletzin *et al.*, 1989). SOR oder *sor*-Gene wurden nur in einigen thermophilen Archaea und im hyperthermophilen Bakterium *Aquifex aeolicus*, aber nicht in Thiobacilli oder *Paracoccus* gefunden (Urich *et al.*, 2004). Die SOR von *A. ambivalens* verkörpert eine neue Familie von mononuclearen nicht-häm Eisenproteinen mit einem niedrigen Reduktionspotential (Urich *et al.*, 2004). Das Holoenzym hat eine apparente Masse von 550 kDa und wird durch 24 Einheiten der 35 kDa Untereinheit aufgebaut (Urich *et al.*, 2004). Im Falle des verwandten Organismus *Acidianus tengchongensis* ist ein Anteil der SOR mit der Cytoplasmamembran assoziiert (Chen *et al.*, 2005).

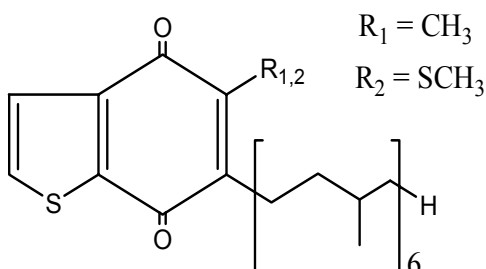
Allerdings koppelt die SOR nicht die Oxidation des Schwefels mit der aeroben Atmungskette (Müller *et al.*, 2004).

Zu Beginn dieser Arbeit war über die Oxidation der Produkte der SOR in *A. ambivalens* weniger bekannt. Die Aktivität einer Sulfit: Akzeptor-Oxidoreduktase (SAOR) aus der Membranfraktion wurde beschrieben, jedoch das Protein noch nicht gereinigt (Abb. 3; Zimmermann *et al.*, 1999). Thiosulfat wird von einer membran- gebundenen Thiosulfat: Akzeptor-Oxidoreduktase (TQO) zu Tetrathionat (TT) oxidiert (Müller, 2003). Sie ist aus zwei Untereinheiten mit den apparenten Massen von 28 und 16 kDa aufgebaut (Abb. 3; Müller, 2003).



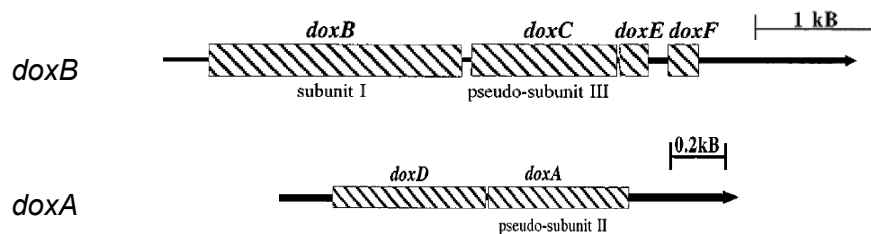
**Abb. 3:** Aerober Schwefelstoffwechsel und Energiegewinnung in *Acidianus ambivalens*. SOR: Schwefel-Oxygenase/-Reduktase; CQ = Caldariella Chinon; Cyt aa3 = Cytochrom aa<sub>3</sub> (Terminale Oxidase); NADH-DH: NADH-Dehydrogenase; SAOR: Sulfit: Akzeptor-Oxidoreduktase; TQO: Thiosulfat: Akzeptor-Oxidoreduktase; neR = nicht-enzymatische Reaktion.

Über die Oxidation von Sulfid in *A. ambivalens* war noch nichts bekannt. Weiterhin war unbekannt, wie Elektronen während der Schwefeloxidation in die Atmungskette eingespeist werden. Es wurde gezeigt, dass durch die Oxidation von NADH ein elektrochemisches Membranpotential aufgebaut werden kann (Gomes *et al.*, 2001a). Dabei wird Caldariella Chinon (CQ; Abb. 4) durch eine Typ II NADH-Dehydrogenase reduziert. Wie NADH in *A. ambivalens* gebildet wird, ist allerdings noch nicht geklärt.



**Abb. 4:** Die Thiophenbenzochinone Sulfolobuschinon (SC) und Caldariellachinon (CC); SC = R<sub>1</sub>, CC = R<sub>2</sub> (Thurl *et al.*, 1986)

*A. ambivalens* besitzt eine einfache Atmungskette, wobei CQ als Elektronenüberträger auf die als Protonenpumpe fungierende terminale Chinol:Sauerstoff Oxidoreduktase (Oxidase) dient (Abb. 3 und 4; Anemüller *et al.*, 1994; Schäfer *et al.*, 1996a, b, 1999; Giuffre *et al.*, 1997; Purschke *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2001b; Das *et al.*, 1999). Die Membran von aerob gewachsenen Zellen enthält hauptsächlich a-Typ, nur Spuren von b-Typ und keine c-Typ Häm Cytochrome (Anemüller *et al.*, 1994). Die a-Typ Cytochrome sind Bestandteile der terminalen Chinoloxidase, ein aa<sub>3</sub>-Typ Hämoprotein aus der Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidasen (Anemüller *et al.*, 1994, Giuffre *et al.*, 1997; Das *et al.*, 1999). Vor dieser Arbeit wurde angenommen, dass sie aus 5 Untereinheiten (DoxA, DoxB, DoxC, DoxD und DoxE) besteht, deren Gene in zwei verschiedenen Operons lokalisiert sind (Purschke *et al.*, 1997, Abb. 5).



**Abb. 5:** *DoxA* und *doxB* Operon aus *A. ambivalens* (aus Purschke *et al.*, 1997).

In den folgenden Abschnitten werden kurz Veröffentlichungen über TS, TT und Sulfid umsetzende Enzyme vorgestellt, da über die Oxidation der Produkte der SOR und der TQO nicht viel bekannt und diese Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war.

## 2.6 Enzymatische Thiosulfatoxidation

Thiosulfat (TS) entsteht im Cytoplasma von *Acidianus ambivalens* vermutlich in einer nicht-enzymatischen Reaktion (Kletzin *et al.*, 1989).

TS wird in Bakterien entweder von dem bereits erwähnten Sox-Komplex oder von den zumeist in Thiobacilli vorkommenden TS-Dehydrogenasen oxidiert (TS-DHn; EC Nummer: 1.8.2.2; Tab. 1; Kelly *et al.*, 1997). Im Gegensatz zum Sox-Komplex wird bei den TS-DHn Tetrathionat als Oxidationsprodukt freigesetzt, welches nach der Hydrolyse über verschiedene Zwischenprodukte zu Sulfat oxidiert wird. TS-DHn nutzen entweder c-Typ Cytochrome und/oder artifizielle Elektronenakzeptoren als Co-Substrate, und manche enthalten selber c-Typ Häme (Tab. 1). Verschiedene TS-DHn wurden aus der peri- oder cytoplasmatischen Fraktion aus mit TS kultivierten



Zellen von neutro- oder acidophilen *Thiobacillus* Spezies gereinigt, wobei jedoch keine membrangebunden war (Visser *et al.* 1997a; Nakamura *et al.* 2001). Die Zusammensetzungen aus den Untereinheiten und Massen dieser Enzyme unterschieden sich erheblich von einander, so dass sie vermutlich nicht von einer gemeinsamen und homologen Enzymfamilie abstammen (Visser *et al.* 1997a; Tab. 1). Gensequenzen der TS-DHn sind bisher unbekannt.

**Tab. 1:** TS-Dehydrogenasen aus verschiedenen Thiobacilli und *Allochrodatum*

Spezies <sup>1</sup>	Masse [kDa]	Cofaktor	Spez. Akt. [U/mg] <sup>2</sup>	K <sub>M</sub> [mM]	pH-Optimum	Quellen
<i>T. thio- parus</i>	115	nicht-häm Eisen	170	0,1	< 4,5	Lyric & Suzuki, 1970
<i>T. te- pi- darius</i>	138 (2 x 45)	keine	320	0,1	n.a. <sup>3</sup>	Lu & Kelly, 1988
<i>T. acido- philus</i>	102 (2 x 20 + 2 x 24)	Cyt. c <sub>553</sub> <sup>4</sup>	4900	0,5	3	Meulenberg <i>et al.</i> , 1993
<i>T. sp. W5</i>	120 (2 x 27 + 2 x 33)	Cyt. c <sub>552</sub>	1210	0,1	5,5	Visser <i>et al.</i> , 1997a
<i>A. thio- oxidans JCM7814</i>	27	Cyt. c	n.a.	0,81	3,5	Nakamura <i>et al.</i> , 2001
<i>A. ferro- oxidans</i>	4 x 45	n.a.	350	0,9	3	Silver & Lundgren, 1968; Janiczek <i>et al.</i> , 2007
<i>Al. vinosum</i>	30	Cyt. c	n.a.	n.a.	4,2	Hensen <i>et al.</i> , 2006

<sup>1</sup>Spezies: *T.*: *Thiobacillus*; *A.*: *Acidithiobacillus*; *Al.*: *Allochrodatum*; <sup>2</sup>Spez. Akt.: Spezifische Aktivität mit Kaliumhexacyanoferrat(III) als Elektronenakzeptor; <sup>3</sup>n.a.: nicht angegeben; <sup>4</sup>Cyt: Cytochrom

## 2.7 Tetrathionat-Hydrolasen

Tetrathionat (TT; S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>) tritt bei der Oxidation von elementarem Schwefel als Zwischenprodukt im Metabolismus von *A. ambivalens* auf und kann auch als alleiniges Substrat zum Wachstum genutzt werden (Müller *et al.*, 2004; Lauber, 2006). Obwohl es Veröffentlichungen über den Tetrathionat (TT)-Metabolismus in Bakterien und dem Archaeon *Acidianus brierleyi* gibt, wurde der Reaktionsmechanismus bis heute noch nicht aufgeklärt (Bugaytsova & Lindström, 2004; Rzhepishevskaya *et al.*, 2007; Emmel *et al.*, 1986). Experimente mit intakten Zellen von *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *A. acidophilum* führten zu der Schlussfolgerung, dass TT enzymatisch hydrolysiert wird, wobei Thiosulfat (TS) und Pentathionat als Produkte gebildet werden (Studel *et al.*, 1987; Hazeu *et al.*, 1988; Meulenberg *et*

*al.*, 1992). Im Gegensatz dazu wurde aus Versuchen mit den gereinigten TT-Hydrolasen (TTHn) aus *A. ferrooxidans* und *A. acidophilum* geschlossen, dass bei der Hydrolyse von TT Schwefel, Sulfat und TS in äquimolaren Mengen gebildet werden (De Jong *et al.*, 1997a, b; Kanao *et al.*, 2007). Es wurden sowohl lösliche im Periplasma lokalisierte TTHs als auch membrangebundene TTHn beschrieben (Meulenbergh *et al.*, 1992; Tano *et al.*, 1996; De Jong *et al.*, 1997a, b; Bugaytsova & Lindström, 2004; Sugio *et al.*, 1996; Hallberg *et al.*, 1996; Kanao *et al.*, 2007). Außer der monomeren TTH aus *A. ferrooxidans* *Funis 2-1* wurden alle anderen als Homodimere mit molekularen Massen von 93 bis 105 kDa charakterisiert (Sugio *et al.*, 1996; Tano *et al.*, 1996; De Jong *et al.*, 1997a, b; Bugaytsova & Lindström, 2004; Kanao *et al.*, 2007).

Ein *tth*-Gen (*tth<sub>af</sub>*) wurde kürzlich in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 identifiziert, dessen Produkt zuvor als schwefelreguliertes äußeres Membranprotein von *A. ferrooxidans* *MSR* mit unbekannter Funktion beschrieben worden war (Kanao *et al.*, 2007; Buonfiglio *et al.*, 1999). Im Genom des extrem thermoacidophilen Archaeons *Metallosphaera sedula* wurde ebenfalls ein *tth*-Gen gefunden (Auernik *et al.*, 2008). Die Primärstruktur des Proteins TTH<sub>af</sub> wies eine signalpeptid-ähnliche Sequenz mit positiv geladenen Aminosäureresten und eine Spaltstelle für die Signalpeptidase I auf (Kanao *et al.*, 2007). Bei mit Schwefel kultiviertem *Acidithiobacillus caldus* wurde keine TTH-Aktivität nachgewiesen, was zur Schlussfolgerung führte, dass die Synthese der TTH substratabhängig ist und entweder transkriptional oder translational reguliert wird (Bugaytsova & Lindström, 2004). Die Regulation des Gen *Clusters* aus *A. caldus* mit dem Gen der Tetrathionat-Hydrolase (*tetH*) wurde kürzlich beschrieben (Rzhepishevskaya *et al.*, 2007). Hierbei wurde eine Aktivierung der TTH (TetH)-Synthese in Anwesenheit von TT, TS und Pyrit gezeigt. Durch bioinformatische Analysen wurde eine Pyrrolochinolin-Chinon (PQQ) Bindedomäne in TetH vorhergesagt und die Anwesenheit eines O-Chinons experimentell nachgewiesen (Rzhepishevskaya *et al.*, 2007).

## 2.8 Enzymatische Sulfidoxidation

Sulfid wird auch als Primärprodukt der Schwefel-Oxygenase/-Reduktase gebildet, dem ersten Enzym im aeroben Schwefelstoffwechsel von *Acidianus ambivalens* (Kletzin, 1989; Kletzin, 1992a, b; Kletzin, 1994).

In Bakterien wird Sulfid in der Regel durch die im Periplasma lokalisierte, membrangebundene oder gelöste Flavocytochrom *c*-Sulfid-Dehydrogenase (FCSD) oder das Flavoprotein Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase (SQR, auch als Sulfid-Chinon-Reduktase bezeichnet) zu Schwefel oxidiert, wobei Cytochrom *c* bzw. Ubichinon reduziert wird (Kusai & Yamanaka, 1973; Kostanjevecki *et al.*, 2000; Dolata *et al.*, 1993; Meyer & Cusanovich, 2003; Friedrich, 1998; Reinartz *et al.*, 1998; Griesbeck *et al.*, 2000, 2002).

Die FCSD wurde unter anderen in den anaeroben, phototrophen Schwefelbakterien *Allochromatium vinosum*, *Ectothiorhodospira vacuolata*, *Chlorobium limicola* und in dem aeroben, chemotrophen Bakterium *Thiobacillus sp. W5* gefunden (Bartsch *et al.*, 1960; Imhoff *et al.*, 1998; Kostanjevecki *et al.*, 2000; Steinmetz & Fischer, 1981; Visser *et al.*, 1997b). *Fcsd*-Gene und Homologe wurden in *Aquifex aeolicus* und *Paracoccus denitrificans* identifiziert (Deckert *et al.*, 1998; Wodara *et al.*, 1997). Aus *Paracoccus pantotrophus* wurde das erste monomere Flavoprotein (SoxF) mit dem Cofaktor Cytochrom *c* und Sulfid-Dehydrogenase Aktivität gereinigt (Quentmeier *et al.*, 2004). Es wies eine 29 - 67%ige Sequenzübereinstimmung mit den Flavoprotein-Untereinheiten der FCSDn von phototrophen Schwefelbakterien auf.

Die mit der Membran assoziierte, aus einer 47 bis 55 kDa Untereinheit bestehende SQR ist wahrscheinlich als Dimer aktiv und wird durch Chinonanaloga inhibiert (Arieli *et al.*, 1994; Schütz *et al.*, 1997; Griesbeck *et al.*, 2000, 2002; Wakai *et al.*, 2007). Sie gehört zur Familie der Glutathion-Reduktasen, die zusammen mit der Lipoamid-Dehydrogenase (E3) Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase, Thioredoxin-Reduktasen und Flavocytochromen *c* in die größere Familie der Flavoproteine Disulfid-Oxidoreduktasen (DiSRn) eingeordnet wird (Schütz *et al.*, 1997; Griesbeck *et al.*, 2002). Neben anderen SQRn wurden auch die Enzyme aus *Allochromatium vinosum*, *Chlorobium limicola* und *Rhodobacter capsulatus* biochemisch charakterisiert (Reinartz *et al.*, 1998; Shahak *et al.*, 1992, 1994; Schütz *et al.*, 1997). Welches der beiden Sulfid oxidierenden Enzyme, FCSD oder SQR, *in vivo* in *Allochromatium* und *Chlorobium* aktiv ist, muss allerdings erst noch aufgeklärt werden (Kostanjevecki *et al.*, 2000). Sie leiten Elektronen von Sulfid in die Elektronentransportkette der anaeroben Photosynthese von *Chlorobium* und *Rhodobacter* oder der Atmungskette von *Paracoccus* und *Aquifex* ein (Kostanjevecki *et al.*, 2000; Griesbeck *et al.*, 2000, 2002; Schütz *et al.*, 1998; Nübel *et al.*, 2000).

Auch in vielen Eukaryonten kommt eine SQR vor, zumeist in den Mitochondrien. Die SQR-Aktivität ist in den Mitochondrien des Wattwurms *Arenicola marina* und der Muschel *Geukensia demissa* mit der Synthese von ATP gekoppelt (Doeller *et al.*, 1999, 2001; Parrino *et al.*, 2000; Völkel & Grieshaber, 1996a, b). Obwohl diese Kopplung auch in Mitochondrien von Hühnern gezeigt wurde, könnte die Funktion der SQR hier nicht in der Produktion von ATP sondern in der Entgiftung liegen (Yong & Searcy, 2001; Theissen *et al.*, 2003). Bis heute konnte noch keine SQR aus einem vielzelligen Eukaryonten gereinigt werden. Andererseits wurde die SQR aus dem Ascomyceten *Schizosaccharomyces pombe* als aktives Protein rekombinant synthetisiert, charakterisiert und *in vivo* gezeigt, dass sie ins Mitochondrium von *S. pombe* importiert wird und dort aktiv ist (Vande Weghe & Ow, 1999). Sie wies deutliche Sequenzähnlichkeiten mit der SQR aus dem  $\alpha$ -Proteobacterium *R. capsulatus* auf (Schütz *et al.* 1997; Theissen *et al.*, 2003). Das Primärprodukt der SQR aus Mitochondrien ist jedoch noch nicht eindeutig bestimmt. Es könnten sowohl Schwefel ( $S^0$ ), Polysulfide ( $HSS_nH$ ) oder Thiosulfat gebildet werden (Griesbeck *et al.* 2002; Yong & Searcy, 2001; O'Brian & Vetter, 1990; Völkel & Grieshaber, 1992; Johns *et al.*, 1997).

Von Vertretern der Archaeen wurde bislang nur gezeigt, dass sie die Fähigkeit besitzen, Sulfid zu oxidieren (Stetter, 1996). Es wurde noch keine archaeale SQR gereinigt oder biochemisch charakterisiert.

## 2.9 Ziel der Arbeit

In früheren Versuchen wurde eine membrangebundene Thiosulfat: Akzeptor-Oxidoreduktase (TQO) aus aerob mit  $S^0$  kultivierten *A. ambivalens* Zellen gereinigt und begonnen, diese biochemisch zu charakterisieren (Müller, 2003). In der vorliegenden Arbeit sollte die TQO ausführlich untersucht und weitere Enzyme gereinigt und charakterisiert werden, welche die Produkte der SQR (Schwefel-Oxygenase/-Reduktase) bzw. der TQO nämlich Sulfid bzw. Tetrathionat umsetzen. Ziel war es somit, die Kenntnisse über den aeroben Schwefelstoffwechsel und die Energiegewinnung von *A. ambivalens* zu erweitern.

## 3. Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien, Chemikalien und Enzyme

Die nicht aufgeführten Chemikalien und Reagenzien stammen von den Firmen Merck (Darmstadt), AppliChem/LS (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (München) oder sind bei den entsprechenden Methoden aufgeführt. Restriktionsenzyme wurden von Fermentas (Heidelberg), Roche (Mannheim) und New England Biolabs (Frankfurt/M) bezogen.

<u>Material, Chemikalie, Enzym</u>	<u>Hersteller</u>
Agarose (Seakem)	FMC/Biocym, Hess.Oldendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Biomax MR Röntgenfilme	Kodak, Rochester
Biodyne A Nylon-Transfermembranen	Pall Corporation
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
CSPD	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG Luminescent Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Dithiotreitol (DTT)	Gerbu, Gaiberg
Gase: H <sub>2</sub> (5,0), N <sub>2</sub> (5,0), CO <sub>2</sub>	Messer, Griesheim
Gene Ruler™ DNA Ladder Mix #SM0331	Fermentas, Heidelberg
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Hefeextrakt	Difco/Nordwald, New York
Kaliumtetrathionat	Merck, Darmstadt
Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, 3 (#SM0191)	Fermentas, Heidelberg
n-Dodecyl-β-D-maltoside (DM)	Gerbu, Gaiberg
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Neuraminidase	Roche, Mannheim
N-Lauroylsarcosine-Natriumsalz	Serva, Heidelberg
O-Glycosidase	Roche, Mannheim
PNGaseF	Roche, Mannheim
Protein Molecular Weight Marker (#SM0431; #SM0679)	Fermentas, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA)	Roche Diagnostics, Mannheim
RNA-Größenstandard	Gibco BRL, Eggenstein
Schwefel, colloidal	Riedel-de Haen, Seelze
Schwefelsäure	Labor-Service GmbH, DA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg

### 3.2 Organismen und Wachstumsbedingungen

*Acidianus ambivalens* (DSM 3772)

*Sulfurisphaera* sp. MC1 (TU-Darmstadt)

*Sulfolobus solfataricus* P1 (DSM 1616)

*Sulfolobus solfataricus* und *Sulfurisphaera sp. MC1* wurden aerob entsprechend veröffentlichter Bedingungen gezogen (Brock *et al.*, 1972; Zillig *et al.*, 1980; Urich, 2001).

*Acidianus ambivalens* wurde aerob und anaerob in einem Mineralmedium (Tab. 2) mit 1% Schwefel ( $S^0$ ) und 0,05% Hefeextrakt kultiviert (Zillig *et al.*, 1985, 1986; Teixeira *et al.*, 1995). Alternativ wurde Tetrathionat (10 mM) anstelle von  $S^0$  als Substrat unter aeroben Bedingungen verwendet. Zur aeroben Anzucht wurde mit  $CO_2$  angereicherter Luft und zur anaeroben Anzucht mit  $CO_2$  und  $H_2$  begast. Die Wachstumszeit bis zur Ernte betrug bei aeroben Kulturen 3 – 4 Tage, bei anaeroben Kulturen bis zu einer Woche.

**Tab. 2:** Medium\* für *Acidianus ambivalens*

Inhaltsstoff	Menge/l
$(NH_4)_2SO_4$	1,5 g
$KH_2PO_4$	2,8 g
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	0,25 g
$CaCl_2 \times 2 H_2O$	0,07 g
$FeSO_4$	0,028 g
$Na_2B_4O_7 \times 10 H_2O$	9 mg
$MnCl_2 \times 4 H_2O$	3,6 mg
$ZnSO_4 \times 7 H_2O$	0,44 mg
$CuCl_2 \times 2 H_2O$	0,1 mg
$VaSO_4 \times 5 H_2O$	0,07 mg
$Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$	0,06 mg
$CoSO_4 \times 7 H_2O$	0,02 mg

\*Medium: Der pH-Wert wurde mit 50%iger Schwefelsäure auf 2,5 eingestellt. Eine Sterilisation erfolgte im Autoklaven.

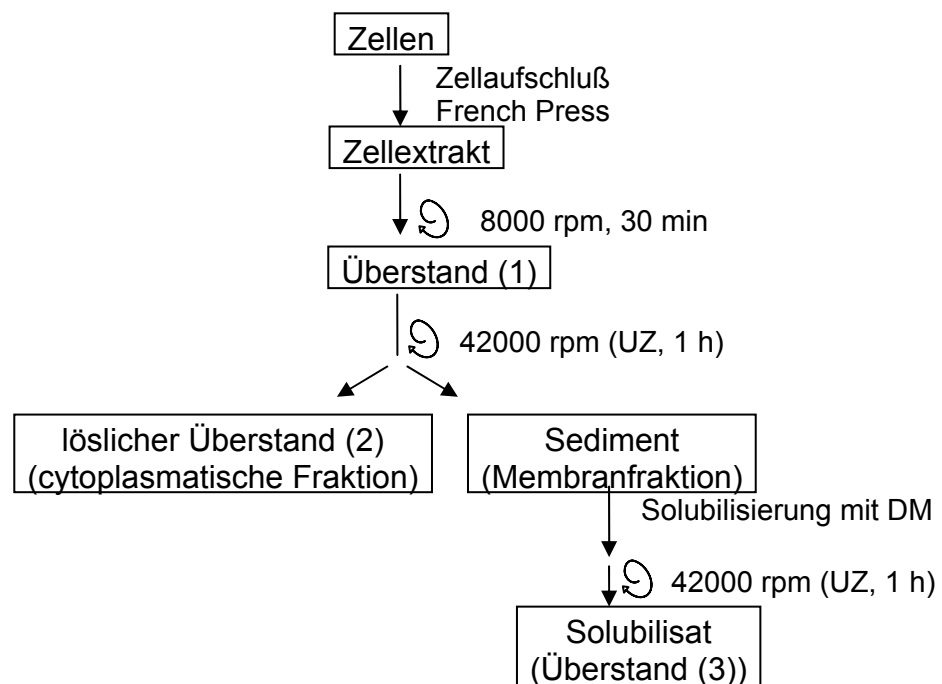
### 3.2.1 Ansetzen einer *A. ambivalens* Kultur und Zellernte

In einem Glasfermenter wurden 14,5 l Medium in einem Ölbad auf 80°C temperiert, begast und mittels Magnetrührer durchmischt. Das Animpfen erfolgte mit 500 ml einer spät exponentiellen/stationären *A. ambivalens* Kultur. Zur Zellernte wurden der Rührfisch und die Gaszufuhr abgeschaltet, so dass der Schwefel auf den Boden der Flasche absinken konnte. Nach 15 Minuten wurde die Kultur mit einer peristaltischen Pumpe abgepumpt und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (Sorvall GS3-Rotor, 4°C, 8000 rpm, 10 min). Das Sediment wurde mit Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 6,5) gewaschen und dann bei - 20°C eingefroren.

### 3.3 Proteinreinigung aus *Acidianus ambivalens*

#### 3.3.1 Zellaufschluß, Präparation der löslichen und der Membranfraktion, sowie Solubilisierung der Membranproteine

Für die Reinigungsversuche der TTH wurden 5 g (1. Versuch) und 2 g (2. Versuch) mit Tetrathionat (TT), aerob kultivierte *A. ambivalens* Zellen und für einen Reinigungsversuch einer SQR 60 g mit S<sup>0</sup>, aerob kultivierte *A. ambivalens* Zellen verwendet. Die Zellen wurden in 5 mM Kaliumphosphat (K<sub>p</sub>i; pH 6,5) oder 20 mM Tris/HCl (pH 6,7) Puffer suspendiert (2 ml Puffer pro g Zellen) und durch Ultraschallbehandlung mit einem Branson Ultraschallgerät für 10 min homogenisiert und teilweise aufgeschlossen. Anschließend wurden 10 µg/ml DNase I und 25 µg/ml RNase A hinzugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte mit einer French Press bei 1,8 kbar und wurde mikroskopisch überprüft (Abb. 6). Das erhaltene Zellysate wurde in



**Abb. 6:** Schema des Zellaufschlusses, der Präparation der Membran- und cytoplasmatischen Fraktion, sowie der Solubilisierung der Membranproteine. UZ = Ultrazentrifugation, DM = Dodecylmaltosid.

einer Sorvall Zentrifuge (RC5C, Sorvall Instruments, DUPONT) im GS3-Rotor für 30 min bei 8000 rpm und 4°C zentrifugiert, um Schwefel und nicht aufgebrochene Zellen abzutrennen. Durch anschließende Ultrazentrifugation des Überstandes (1) (Zellextrakt) für eine Stunde bei 42000 rpm und 4°C im 45 Ti Rotor einer Beckmann

Ultrazentrifuge (Optima XL-100K) wurde die lösliche, cytoplasmatische Fraktion (dunkelbrauner Überstand (2)) von der Membranfraktion (grünes Sediment) getrennt (Abb. 6). Das Detergenz Dodecylmaltosid (DM) wurde verwendet, um die Proteine aus der Membran herauszulösen. Hierfür wurde die Membranfraktion in Kaliumphosphatpuffer (40 mM, pH 6,5) suspendiert und nach Zugabe von 2 % DM für 12 Stunden bei 4°C langsam gerührt. Durch eine hierauf folgende Ultrazentrifugation bei 125000 g und 4°C für 1 Stunde wurden die solubilisierten Proteine, die im Überstand (3) (Membransolubilisat) verblieben, von Zellwandbruchstücken und Ribosomen getrennt (Abb. 6). Das Membransolubilisat und die lösliche Fraktion wurden für die anschließende chromatographische Proteinreinigung getrennt voneinander verwendet (3.3.2).

### 3.3.2 Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie erfolgte bei 4°C oder RT unter Verwendung eines FPLC Systems (Pharmacia). Salzgradienten und Proteinelution wurden durch Messung der Leitfähigkeit [mS] und der Absorption bei 280 nm verfolgt. Die Äquilibration der Säulen erfolgte durch Waschen mit Elutionspuffer (3faches Säulenvolumen) und anschließend mit Auftragspuffer (5faches Säulenvolumen). Als Puffer wurde Kaliumphosphat (40 mM, pH 6,5) oder Tris/HCl (50 mM, pH 6,7) verwendet. Die Elutionspuffer enthielten zusätzlich 1 M NaCl, die Puffer für die Gelfiltrationschromatographie zusätzlich 100 mM NaCl und die Puffer für die Reinigung von Membranproteinen zusätzlich 0,1% Dodecylmaltosid (DM). Die Puffer wurden vor der Verwendung filtriert und entgast. Die aufgetragenen Proteinmengen betragen maximal 10% der Gesamtbindekapazität einer Säule. Vor dem Auftragen wurden Proteinextrakte bei 100.000 g und 4°C für 45 min ultrazentrifugiert, um Partikel zu sedimentieren, die eine Säule verstopfen könnten. Die Flussrate wurde dem verwendeten Säulenmaterial nach Angaben des Herstellers angepasst. Nach dem Auftragen der Proteine wurden die Säulen solange mit Auftragspuffer gewaschen, bis die nicht gebundenen Proteine entfernt waren. Alle Proteine wurden in geeigneten Fraktionsvolumina gesammelt. Fraktionen mit Aktivität (TQO, TTH, SOR oder SQR) wurden vereint. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei 4°C oder auf Eis. Wenn längere Zeiträume zwischen den Reinigungsschritten (mehr als 3 Tage) vorgesehen waren, wurden die Proteine bei -20°C eingefroren. Vor einem weiteren Reinigungsschritt oder Messen einer Aktivität erfolgte bei Bedarf ein Austausch der



Puffer, in denen die Proteine gelöst waren, oder eine Konzentrierung mit Nanosep10K, 30K-, Centricon30- oder Jumbosep-Konzentratoren (Pall Gelman) nach Angaben des Herstellers. Abhängig von den Fraktionsgrößen und Proteineigenschaften wurden hierfür auch Dialyseschläuche verwendet.

### **3.3.2.1 Reinigungsversuche einer Tetrathionat-Hydrolase**

Mehrere säulenchromatographische Reinigungsversuche einer Tetrathionat-Hydrolase (TTH) wurden durchgeführt, von denen zwei hier exemplarisch dargestellt sind.

#### **1. Versuch**

Für die gesamte erste Reinigung wurde Kaliumphosphatpuffer verwendet.

#### **1. und 2. Schritt, DEAE-Anionenaustauschchromatographie**

498 mg cytoplasmatische Proteine wurden auf eine DEAE-Säule (Säulenvolumen ( $V_S$ ): 10 ml) aufgetragen. Der lineare NaCl-Gradient von 0 bis 1 M erfolgte im Elutionsvolumen von 148 bis 198 ml. Die Fraktionen (je 4,6 ml) wurden auf Tetrathionat-Hydrolase (TTH)-Aktivität getestet. Aktive Fraktionen wurden zur Fraktion „TTH DE1“ vereint.

Um die Auftrennung zu verfeinern, wurde der Reinigungsschritt mit einem flacheren Gradienten wiederholt, der im Elutionsvolumen von 0 bis 300 ml erfolgte (0 bis 1 M NaCl). Vor dem Auftragen von 40 mg Protein auf die Säule wurde der Puffer der Fraktion „TTH DE1“ mit einem Konzentrator (Jumbosep, Ausschlussvolumen 30 kDa) gewechselt, um das NaCl zu entfernen. Die Fraktionen (jeweils 12,5 ml) mit TTH-Aktivität wurden zur Fraktion „TTH DE2“ vereint.

#### **3. Schritt, MonoQ-Anionenaustauschchromatographie**

Im dritten Reinigungsschritt wurden in zwei getrennten Läufen jeweils 8 mg Protein der Fraktion „TTH DE2“ auf eine MonoQ-Säule ( $V_S = 1$  ml) aufgetragen, nachdem der Puffer gewechselt war. Der lineare NaCl-Gradient von 0 bis 1 M erfolgte im Elutionsvolumen von 53 bis 104 ml. TTH-aktive Fraktionen (jeweils 1 ml) wurden zur Fraktion „TTH MQ“ vereint.

#### **2. Versuch**

Für die gesamte zweite Reinigung wurde Tris/HCl Puffer verwendet, weil Pyrophosphatase (PPase)-Aktivität gemessen wurde. Die Messung der PPase-Aktivität war mit in  $KP_i$ -Puffer gelösten Proteinen schwierig.

### **1. Schritt: Hydroxyapatit (HTP)-Chromatographie**

200 mg cytoplasmatische Proteine wurden in acht getrennten Läufen mit jeweils 25 mg auf eine Hydroxyapatit-Säule ( $V_S = 13$  ml) aufgetragen. Ein zweistufiger  $P_i$ -Gradient von 0 bis 1 M erfolgte im Elutionsvolumen von 79 bis 110 ml. TTH-aktive Fraktionen (je 5,1 ml) wurden zur Fraktion „TTH HTP“ vereint.

### **2. Schritt: Q-Sepharose, Anionenaustauschchromatographie**

Im zweiten Schritt wurden 25 mg Protein der Fraktion „TTH HTP“ auf eine Q-Sepharose-Säule ( $V_S = 5$  ml) aufgetragen. Der lineare NaCl-Gradient von 0 bis 1 M erfolgte im Elutionsvolumen von 95 bis 133 ml. Fraktionen (jeweils 2 ml) mit einer spezifischen TTH-Aktivität kleiner als 0,14 U/mg wurden zur Nebenfraktion „TTH Q-Seph. NF“ und größer als 0,13 U/mg zur Hauptfraktion „TTH Q-Seph. HF“ vereint.

### **3. Schritt: MonoQ und Surperdex S-200**

Im dritten Schritt wurden 0,7 mg Protein der Fraktion „TTH Q-Seph. HF“ auf eine MonoQ-Säule ( $V_S = 1$  ml) aufgetragen. Der lineare NaCl-Gradient von 0 bis 1 M erfolgte im Elutionsvolumen von 0 bis 21 ml. Aktive Fraktionen (jeweils 1 ml) wurden zur Fraktion „TTH MQ2“ vereint.

Alternativ wurde versucht, die TTH durch Gelfiltrationschromatographie (Surperdex S-200) zu reinigen. 7,5 ml (2 mg Protein) der Fraktion „TTH Q-Seph. HF“ wurden mit Centricon30 Konzentratoren konzentriert (Endvolumen: 3 ml) und aufgetragen. Fraktionen (jeweils 5 ml) mit einer Absorption bei 280 nm größer als 0,000 wurden mit Nanosep10K Konzentratoren (Ausschlussvolumen 10 kDa) konzentriert. Die TTH-Aktivität dieser Fraktionen wurde gemessen.

#### **3.3.2.2 Reinigungsversuch einer Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase (SQO)**

Für die Reinigung wurde Kaliumphosphatpuffer verwendet.

##### **1. Schritt: DEAE-Sepharose, Anionenaustauschchromatographie**

1600 mg solubilisierte Membranproteine wurden auf eine DEAE-Säule ( $V_S: 350$  ml) aufgetragen. Der lineare NaCl-Gradient von 0 bis 1 M erfolgte im Elutionsvolumen 600 bis 2100 ml. Die Fraktionen wurden jeweils auf SQO- (Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase), TQO- (Thiosulfat-Chinon-Oxidoreduktase), SOR- (Schwefel Oxygenase Reduktase) und NADH-DH- (NADH-Dehydrogenase Typ II) Aktivität getestet. Die aktive SQO Fraktion („SQO DE“) wurde für eine HTP-Chromatographie verwandt.

## **2. Schritt: Hydroxyapatit (HTP)-Chromatographie**

200 mg Protein der Fraktion „SQR DE“ wurden auf eine Hydroxyapatit-Säule ( $V_s$ : 30 ml) aufgetragen. Ein linearer Phosphat-Gradient von 0 bis 1 M erfolgte im Elutionsvolumen von 80 bis 250 ml. SQR-aktive Fraktionen (je 10 ml) wurden zur Fraktion „SQR HTP“ vereint. Außerdem wurde die SQR-Aktivität in den Fraktionen gemessen.

## **3. Schritt: Gelfiltrationschromatographie (Superdex S-200)**

30 mg Protein der Fraktion „SQR HTP“ wurden auf eine Superdex S-200 Säule aufgetragen. Hierfür wurde der Puffer von 23 ml der Fraktion mit einem Jumbosep-Konzentrator gewechselt und anschließend mit einem Nanosep 30K-Konzentrator konzentriert (Endvolumen: 3 ml). Die Fraktionen wurden auf SQR-Aktivität getestet. Aktive Fraktionen wurden zur Fraktion „SQR S200“ vereint.

### **3.3.3 Solubilisierung der TTH durch Spheroplastierung**

Aufgrund einer möglichen Sekretion der TTH in das Pseudoperiplasma wurde versucht, *Acidianus ambivalens* Zellen zu spheroplastieren und die pseudoperiplasmatischen Proteine von den Spheroplasten durch Zentrifugation oder Filtration als zellfreie Extrakte zu trennen (Dyall-Smith, 2003, verändert).

Dreimal 0,5 g Zellen wurden jeweils in Spheroplastierungslösung (18 % Saccharose, 100 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8,2) mit 10, 25 oder 50 mM EDTA suspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurden 0,5 g Zellen in Spheroplastierungslösung mit 50 mM EDTA durch Ultraschall aufgeschlossen. Die Zellsuspensionen wurden mikroskopiert, und die Ansätze mit 10 und 50 mM EDTA in einer Sorvallzentrifuge mit einem SS-34 Rotor für 15 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden als zellfreie Extrakte 10, 50 und AZ (10 bzw. 50 mM EDTA, AZ: aufgeschlossene Zellen) bezeichnet. Der Ansatz mit 25 mM EDTA wurde mit einem Sterilfilter (Pall) filtriert, und das Filtrat als zellfreier Extrakt 25 bezeichnet. Die Überstände und das Filtrat wurden 24 Stunden unter Rühren gegen 40 mM  $KP_i$  (pH 6,5) bei 4°C dialysiert, um niedermolekulare Substanzen und Saccharose zu entfernen, und die Auswirkungen auf die TTH-Aktivität untersucht. Absorptionsspektren von den Fraktionen wurden vor und nach der Dialyse in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 800 nm gemessen. Das Filtrat und die Überstände wurden auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen (20 µg pro Fraktion).

### 3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

#### Nach Bradford (Bradford, 1976)

In Gegenwart von Proteinen und im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brilliantblau G250 von 465 zu 595 nm.

20 µl Proteinlösung oder 20 µl H<sub>2</sub>O als Referenz wurden mit 980 µl Bradford-Reagens (0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250; 4,75 % (v/v) Ethanol; 8,5 % (v/v) Phosphorsäure) gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Standardreihe mit Rinderserumalbumin (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/ml) erstellt.

#### Nach der E 280-Methode (Gill & Hippel, 1989)

Bei einer Wellenlänge von 280 nm entspricht eine optische Dichte von 1 einem Proteingehalt von 0,5 bis 1,5 mg/ml, abhängig vom Gehalt an Tryptophan, Prolin und Tyrosin im Protein.

#### Nach einer modifizierten Mikrobiuret-Methode (Watters, 1978)

Die Biuret Methode beruht darauf, dass Cu<sup>2+</sup> durch Proteine zu Cu<sup>1+</sup> reduziert wird. Cu<sup>1+</sup> bildet mit der vorliegenden Säure einen Komplex, der Licht bei einer bestimmten Wellenlänge stark absorbiert.

In einem Eppendorfgefäß wurden 0,2 ml der zu bestimmenden Proteinlösung mit 1 ml Biuret-Reagenz (1,5 g Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat; 4,9 g Dinatriumdihydroxyfumar säure Dihydrat; 7,5 g Natriumhydroxid; ad H<sub>2</sub>O 1 l) gemischt und 30 Minuten lang bei RT inkubiert. Als Referenz wurde Wasser verwendet. Die Absorptionen wurden bei 540 nm gemessen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Standardreihe mit BSA in 0,1% Dodecylmaltosid (DM) angesetzt.

### 3.5 SDS-PAGE Analyse

Als Massenstandards wurden #SM0431 und #SM0679 (MBI Fermentas) verwendet. Zur Denaturierung der Proteine wurden diese vor dem Auftragen in Probenauftragungspuffer (60 mM Tris/HCl; pH 6,8; 2% SDS; 10% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau; 0,015 g/ml Mercaptoethanol; 4 M Harnstoff) für entweder eine Stunde bei RT oder 3 Minuten bei 95°C inkubiert. Pro Spur wurden 1 bis 30 µg Proteine auf 10%ige Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgele (Trenngel: 10% Acrylamid; 0,26% Bisacrylamid; 10% Glycerin; 0,03% APS; 0,03% TEMED; Sammelgel: 4% Acrylamid; 0,11% Bisacrylamid; 0,03% APS; 0,03% TEMED; jeweils in Gelpuffer (1 M Tris/HCl, 0,1 % SDS, pH 8,45); Kathodenpuffer: 0,1 M Tris; 0,1 M

Tricin; 0,1% SDS; pH 8,25; Anodenpuffer: 0,2 M Tris/HCl; pH 8,9; Schagger & von Jagow, 1987) aufgetragen und bei 60 bis 120 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend in kolloidaler Coomassie-Färbelösung (Roti-Blue) bei leichtem Schütteln über Nacht gefärbt und danach solange mit deionisiertem Wasser entfärbt, bis sich Proteinbanden deutlich vom Hintergrund unterscheiden ließen. Zur Dokumentation wurden diese mit einem Scanner am Computer eingescannt.

### 3.5.1 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Bei geringen Proteinkonzentrationen ( $\leq 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wurden Proteine vor dem Auftragen mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt (Porath *et al.*, 1960). Hierfür wurden 500  $\mu\text{l}$  Proteinlösung mit 250  $\mu\text{l}$  20% TCA versetzt und 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf). Das Sediment wurde in einer *SpeedVac* getrocknet und anschließend in 15  $\mu\text{l}$  1 M Tris/HCl pH 6,8 resuspendiert.

### 3.6 Semidry Blot für Proteine

Um Proteine N-terminal zu sequenzieren, wurden sie nach der Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran (Amersham Pharmacia Biotech) übertragen. Der Transfer erfolgte durch einen *semidry* Blot für 5 Stunden bei einer Spannung von 15 Volt (ca. 150 mA). Der Blot wurde mit dem horizontalen Graphitplattensystem Multiphor NovaBlot (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt und wie folgt aufgebaut:

- a. 2 in Anodenpuffer (300 mM Tris, pH 8,8; 100 mM Tricin) getränkte Filterpapiere wurden auf die untere Graphitplatte (Anode) gelegt.
- b. Die PVDF Membran, die zuerst in Methanol und dann in Anodenpuffer gelegt worden war, wurde auf das Papier gelegt.
- c. Das SDS-Gel wurde daraufhin auf die Membran gelegt, ohne es vorher in einen Puffer zu legen.
- d. 2 in Kathodenpuffer (30 mM Tris, pH 8,7; 300 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure) eingeweichte Filterpapiere wurden auf das Gel gelegt.
- e. Ein 5 kg Gewicht wurde auf die obere Graphitplatte gestellt, um eine Ausdehnung des Gels während des Transfers zu verhindern.

Beim Aufeinanderstapeln der einzelnen Schichten des Blots wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen ihnen bilden. Zur Vermeidung von Kriechströmen wurden Parafilmstreifen um das Gel gelegt.

Zur Färbung der Proteine wurde die PVDF Membran nach dem Transfer 5 Minuten in Färbelösung (25% Methanol; 10% Essigsäure; 0,02% Coomassie Serva blue R) geschwenkt. Serva blue R hat keine negativen Effekte auf das anschließende N-terminale Sequenzieren. Anschließend wurde der Färbehintergrund durch Entfärbelösung (25% Methanol, 10 % Essigsäure) reduziert, bis die Proteinbanden klar erkennbar waren. Die Membran wurde hierauf 10 min in deionisiertem Wasser geschwenkt und zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

### **3.7 N-terminale Sequenzierung**

Zur Identifizierung von Proteinen wurden diese N-terminal sequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit öffentlichen Datenbanken verglichen. Die Sequenzierung wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Lottspeich, Martinsried durchgeführt (Edmann & Begg, 1967).

### **3.8 MALDI-TOF Analyse**

Um die 16 kDa Untereinheit der TQO zu identifizieren, wurde eine MALDI-TOF Masse-Fingerprinting Analyse (Chapman, 1996) mit der aus einem SDS-Gel ausgeschnittenen, Coomassie-gefärbten Proteinbande von der Firma Esplora (Darmstadt) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden durch MSFIT und MASCOT Analyse ausgewertet.

### **3.9 Chinon Extraktion**

200 µl Proteinlösung (0,36 – 6,5 mg) wurden mit 1 ml 50% Methanol 50% Aceton gemischt und 30 min lang geschüttelt. Anschließend wurden 750 µl N-Hexan hinzugegeben, 1 min gemixt und 1 min bei 2000 g zentrifugiert. Hierauf wurde die obere N-Hexan Phase, in der das Chinon enthalten war, in ein zweites Gefäß überführt. Die Extraktion wurde mit der unteren Phase wiederholt, um die Ausbeute zu erhöhen. Die oberen Phasen wurden vereint, N- Hexan mit Stickstoff evaporiert und der Rückstand in 50 µl Methanol aufgenommen.

### **3.10 Messungen der Absorptionsspektren**

Absorptionsspektren wurden mit einem Photometer (DU 640; Beckmann) in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 800 nm gemessen. Als Referenz wurde Wasser verwendet.

### 3.11 Fluoreszenz Spektroskopie

Um zu untersuchen, ob Caldariella Chinon (CQ) Bestandteil der TQO ist, wurden Fluoreszenz Spektren von der TQO, von CQ und von aus der TQO extrahiertem Chinon gemessen. Die Spektren wurden von 340 bis 600 nm in 1 nm Intervallen mit einer Messgeschwindigkeit von 600 nm/min und einer Durchschnittszeit von 0,1 Sekunden gemessen. Die Anregungswellenlänge lag bei 330 nm und die Emissionswellenlänge bei 350 nm. Die Messungen wurden mit einem Varian Cary Eclipse Spectrofluorimeter durchgeführt. Der Küvettenmessweg betrug 1 cm. Die gereinigte TQO (8 µg/ml) war in 40 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5 mit 0,1% DM gelöst und das CQ in n-Hexan solubilisiert.

### 3.12 Circulardichroismus-Spektroskopie

Um die Sekundärstruktur der TQO zu analysieren, wurde eine CD Spektroskopie durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit einem Jasco J810 Spectropolarimeter. Der Messweg der Küvette betrug 0,2 cm. Die Messgeschwindigkeit betrug 50 nm min<sup>-1</sup> und die Bandbreite 2 nm. Die Messungen wurden mit 1 nm Intervallen und einer Responsezeit von 0,25 Sekunden durchgeführt. Für eine statistische Absicherung wurden diese zehnmal wiederholt. Für eine Messung wurden 100 µg TQO (Holoenzym) pro ml in 40 mM Kaliumphosphatpuffer (KP<sub>i</sub>), pH 6,5, 0,0025% Dodecylmaltosid (DM) oder die Untereinheit DoxD eingesetzt. Die Absorptionswerte des Puffers wurden abgezogen und die Spektren mit einem vom Hersteller (Jasco) mitgelieferten Programm bearbeitet (geglättet). Die erhaltenen Messwerte in mdeg (millidegrees) wurden in die molare Ellipsizität pro Rest durch folgende Formel umgerechnet:

$$\Theta_{\text{mrd}} = \Theta_{\text{d}} / 10^3 * (M / (c * d * n_{\text{res}}))$$

Mit folgenden Faktoren:

$\Theta_{\text{mrd}}$  = Molare Ellipsizität pro Rest [deg \* cm<sup>2</sup> \* d mol<sup>-1</sup> \* res<sup>-1</sup>]

$\Theta_{\text{d}}$  = Ellipsizität [mdeg]

M = Molare Masse des Proteins [g \* d mol<sup>-1</sup>]

c = Protein Konzentration [mg \* cm<sup>-3</sup>]

d = Messweg in der Küvette [cm]

$n_{\text{res}}$  = Anzahl der Aminosäurereste

Um den Gehalt der  $\alpha$ -Helices und der  $\beta$ -Faltblätter zu bestimmen, wurde das Spektrum zwischen 190 und 250 nm und die Programme CONTIN&SOL;LL, CDSSTR und SELCON3 des CDPro Software Packets mit einem Referenzsatz von 43 Proteinen (Sreerama & Woody, 2000) verwendet.

### 3.13 Metallgehaltsbestimmung durch TXRF Analyse

Um Hinweise auf mögliche Cofaktoren der TQO zu erhalten, wurde eine Metallgehaltsbestimmung von gereinigter TQO durch eine TXRF (Röntgenstrahlen-Fluoreszenzspektroskopie) Analyse durchgeführt. Hiefür wurde 25  $\mu\text{M}$  gereinigte TQO in 100  $\mu\text{l}$  20 mM Tris-Acetat-Puffer (pH 6,8) mit 0,1 % DM verwendet. Die Analyse wurde mit einem EXTRAIIA Messgerät (Atomika Instruments) am Institut für anorganische und analytische Chemie der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main von Claudia Rittmeyer im Arbeitskreis Prof. B.O. Kolbesen durchgeführt. Die Anregung erfolgte mit W-L $\alpha$  (Filter 2), Mo-K $\alpha$  (Filter 1) und W (Brems) Filter 2. Die Messzeit betrug 1000 s und das Probenvolumen 4  $\mu\text{l}$ . Als interner Standard wurde Cr (1 mg/l) und als Probenträger Quarz verwendet. Die Konzentrationen der Elemente S, Cl, Ca, Fe, Cu, Zn und Br wurden bestimmt. Als Blindprobe wurde Puffer verwendet und von den Messwerten der TQO abgezogen.

### 3.14 Massenspektrometrie

Um die Chinon Cofaktoren der TQO zu identifizieren, wurden Chinonextraktionen (3.9) mit gereinigter TQO (360  $\mu\text{g}$ , Chinon: 3  $\mu\text{g}$ ), den TQO Fraktionen nach den ersten beiden FPLC Reinigungsschritten (Q-Sepharose 520  $\mu\text{g}$ , Chinon: 5  $\mu\text{g}$ ; HTP 1,4 mg, Chinon: 30  $\mu\text{g}$ ), dem Membransolubilisat (6,5 mg, Chinon: 16  $\mu\text{g}$ ) und der Membranfraktion (3,3 mg, Chinon: 19  $\mu\text{g}$ ) von *A. ambivalens* durchgeführt, und die Extrakte massenspektrometrisch untersucht. Die Massenspektren wurden mit einem Bruker-Franzen Esquire LC Massenspektrometer mit Elektronenspray Ionisierung im negativen Modus von der massenspektrometrischen Abteilung des Clemens Schöpfer Institutes der organischen Chemie und Biochemie der TU Darmstadt (J. J. Veith) gemessen.

### 3.15 Nachweis einer Glycosylierung durch Alcianblau Färbung

Die Proteine wurden zunächst durch SDS-PAGE aufgetrennt (Kap. 3.5). Zum Fixieren der Proteine wurde das Gel 30 min in 12,5% TCA geschwenkt. Anschließend wurde das Gel kurz mit Wasser gewaschen und dann zur Oxidation der Glycoproteine 50 min in 1 % Perjodsäure, 3 % Essigsäure geschwenkt. Das Gel wurde hierauf ein zweites mal mit Wasser gewaschen (1 min) und dann 30 min in 0,5% Kaliumdisulfit geschwenkt, um überschüssige Periodsäure zu entfernen. Nach einem weiteren Waschschrift mit Wasser erfolgte über Nacht die Färbung der



glycosylierten Proteine mit 0,5% Alcian Blau in 3% Essigsäure (nach Wardi & Michos, 1972). Eine Entfärbung des Gels erfolgte in 10% Essigsäure. Anschließend wurden nicht-glycosylierte Proteine durch Färbung mit Coomassie sichtbar gemacht. Die gereinigten Proteine TQO, terminale Oxidase und SOR (Schwefel-Oxygenase/-Reduktase), sowie die Membranproteine von *A. ambivalens* wurden auf Glycosylierung untersucht.

### **3.16 Deglycosylierung der TQO**

#### **3.16.1 Enzymatische Deglycosylierung**

10 µg TQO wurden in 100 µl Natriumphosphat (20 mM; pH 7,2) mit 2 U N-Glycosidase F, 2,5 mU O-Glycosidase und 2 mU Neuraminidase (Roche, Mannheim) für 96 h bei 37°C und als Kontrolle ohne Glycosidasen inkubiert. Nach 24, 72 und 96 Stunden wurden jeweils 20 µl entnommen, mit 10 µl 3x SDS-Probenauftragspuffer versetzt und bei 95°C für 2 min denaturiert. Eine Analyse erfolgte über SDS-PAGE und Färbung mit Alcianblau und danach Coomassie.

20 µg TQO wurden in 0,5 % SDS und 1 % β-Mercaptoethanol bei 100°C für 10 min denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 50 mM Natriumphosphat Puffer (pH 7,5), NP-40 (1 %; BioLabs) und 1 U PNGase F (oder 1 U PNGase F + 1 U Endo H (BioLabs)) hinzugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Zudem wurde versucht, die TQO ohne vorherige Denaturierung mit PNGase F und Endo H zu deglycosylieren.

#### **3.16.2 Chemische Deglycosylierung**

Da die chemische Deglycosylierung mit TFMS (Trifluormethan-Sulfonsäure; Sojar & Bahl, 1987) in absolut wasserfreiem Milieu stattfinden muss, um eine Hydrolyse der Peptidbindungen zu vermeiden, wurden gasdichte und chemisch inerte Hamiltonspritzen vor der Verwendung mit Aceton gereinigt, über Nacht bei 60°C getrocknet und in ein Gefäß mit Trockenmittel überführt.

300 µg Protein wurden mit 7% TCA gefällt (Kap. 3.5.1) und über Nacht in einer *SpeedVac* getrocknet, um ein wasserfreies Milieu zu gewährleisten. Danach wurde das Reaktionsgefäß mit Stickstoff begast und 20 Sekunden in einem Ethanol/Trockeneisbad abgekühlt. Anschließend wurde das Sediment mit 280 µl TFMS/Toluol (250 µl TFMS + 30 µl Toluol) versetzt und 4 Stunden bei -20°C inkubiert, wobei nach 10 min die Ansätze vorsichtig geschüttelt wurden, um eine

homogene Mischung herzustellen. Um die Reaktion zu stoppen, wurden nach der Inkubation 150 µl Pyridin/Methanol/Wasser (3:1:1) hinzugeben und dann 5 min im Ethanol/Trockeneisbad und 15 min auf Eis inkubiert. Zum Neutralisieren wurden 400 µl 0,5 % Ammoniumbicarbonat hinzugegeben. Zum Abschluss wurden die Proteine mit 7% TCA gefällt und auf ein SDS-PAG aufgetragen.

Als Kontrollen wurden die glycosylierten Proteine BSA (Rinderserumalbumin) und VSG (variables Oberflächenprotein von Trypanosomen; AG Göringer, TU Darmstadt) für die Deglycosylierung mit TFMS verwendet. Als Negativkontrollen wurden Ansätze mit Puffer (40 mM Kpi, pH 6,5) anstelle von TFMS hergestellt.

### 3.17 Aktivitätstests

#### 3.17.1 TQO-Aktivitätsmessung mit Kaliumhexacyanoferrat(III)

TQO-Aktivität wurde spektrophotometrisch durch die Verfolgung der Thiosulfat (TS)-abhängigen Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat(III) ( $K_3Fe(CN)_6$ ) bei 420 nm und 80°C in einem beheizbarem Küvettenhalter des Spektralphotometers (Beckmann DU 640) in einem Reaktionsvolumen von 1 ml gemessen. Ein Reaktionsansatz enthielt 50 mM BisTris (pH 6, eingestellt mit HCl), 1,25 mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 1,25 mM Zitronensäure, 10 mM TS und Proteinlösung (Trudinger, 1961, verändert). Die Reaktion wurde durch Zugabe von entweder 100 µl 100 mM TS Lösung in Wasser oder Proteinlösung gestartet. Jede Aktivitätsmessung wurde mit der nicht-enzymatischen TS-Oxidationsrate korrigiert. Die Enzymaktivität wurde aus der Absorptionsabnahme über das Lambert-Beersche Gesetz ermittelt und in Unit (U) angegeben. Die Einheit U wurde definiert als die Oxidation von 1 µmol TS bzw. die Reduktion von 1 µmol  $K_3Fe(CN)_6$  ( $\epsilon_{420} [K_3Fe(CN)_6] = 1020 M^{-1} cm^{-1}$ ) in einer Minute.

#### 3.17.2 TQO-Aktivitätsmessung mit Decylubichinon

Um zu untersuchen, ob TQO Chinon reduziert, wurden Aktivitätstests mit Decylubichinon (DQ) als künstlichem Elektronenakzeptor photometrisch bei 291 nm durchgeführt ( $\epsilon_{ox-red} = 5033 M^{-1} cm^{-1}$ ). Die Messungen erfolgten anaerob unter Stickstoff- oder  $N_2/H_2$ - (95:5) Atmosphäre in gasdichten Küvetten (Hellma) bei 80°C in einem Endvolumen von 1 ml. Als Reaktionspuffer wurde 50 mM BisTris, pH 6, 0,1% DM verwendet. Nach der Zugabe von 1 µl DQ Lösung (31 mM in Ethanol) und 5 µl 2 M Thiosulfat wurde die Reaktion durch Zugabe von 9 µg TQO gestartet. Als Kontrolle wurde jede mögliche Reihenfolge der Zugaben der Substrate und des

Proteins getestet. Um zu testen, ob die DQ Reduktion enzymatisch bedingt war, wurde TQO in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (2,5; 10; 15 µg/ml). Die Einheit Unit wurde definiert als die Reduktion von 1 µmol DQ/min.

### 3.17.3 TQO-Aktivitätsmessung mit Cytochrom c

Um die Aktivität der TQO mit Cytochrom c (aus Pferde-Herz) als Elektronenakzeptor zu messen wurden 40 µl 1 mM Cyt c (in 40 mM HEPES Puffer, pH 7) zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Die Absorptionsänderung wurde bei 550 nm und 80°C gemessen. Die Durchführung entsprach der TQO-Aktivitätsmessung mit DQ (3.16.2).

### 3.17.4 SQO-Aktivitätsmessung mit Decylubichinon

Verschiedene Reaktionspuffer wurden getestet (Tab. 3), um eine möglichst geringe Hintergrundsreaktion bei hoher Temperatur zu erhalten.

**Tab. 3:** Getestete Reaktionspuffer

Nr.	Bezeichnung	Reaktionspuffer
1	BisTris	50 mM BisTris, pH 6,5; 0,1 % DM
2	40KP	40 mM $KP_i^*$ , pH 6,5; 0,1 % DM
3	20KPE	20 mM $KP_i$ ; 6,5; 0,1 % DM; 1 mM EDTA
4	10KPE	10 mM $KP_i$ , pH 6,7; 0,1 % DM; 2 mM EDTA

\* $KP_i$ : Kaliumphosphatpuffer

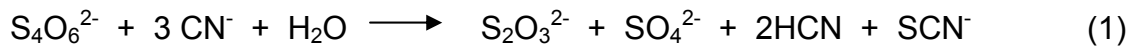
Die SQO-Aktivität (Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase) wurde mit 62 µM Decylubichinon (DQ) als Elektronenakzeptor und 1 mM Natriumsulfid ( $Na_2S$ ) als Substrat photometrisch bei 291 nm und 70°C schließlich in Reaktionspuffer 4 (Tab. 3) gemessen (nach Schütz *et al.*, 1997; verändert). Die Messungen erfolgten in einem Endvolumen von 1 ml, anaerob unter Stickstoff-Atmosphäre in gasdichten Küvetten (Hellma). Die Durchführung entsprach der TQO-Aktivitätsmessung mit DQ (Kap. 3.16.2).

### 3.17.5 Messung der TTH-Aktivität

#### 3.17.5.1 Cyanolyse: Tetrathionat- und Thiosulfatnachweis

Um den Umsatz von Tetrathionat (TT,  $S_4O_6^{2-}$ ) und die Bildung von Thiosulfat (TS,  $S_2O_3^{2-}$ ) beim TTH-Aktivitätstest nachzuweisen, wurde die Cyanolyse, ein chemischer und photometrischer Nachweis von TT und TS in Gemischen, angewandt (nach Kelly

*et al.*, 1969). Hierbei beruht der Nachweis von TT auf der Cyanolyse von TT durch Cyanid (CN<sup>-</sup>) unter Bildung von Thiocyanat (SCN<sup>-</sup>), welches nach der Zugabe von Eisennitrat als Eisenthiocyanatfarbkomplex nachgewiesen werden kann (Gleichung 1).



Der TS-Nachweis beruht auf der durch Kupferionen katalysierten Cyanolyse von TS durch Cyanid (Gleichung 2).



Beim Vorliegen eines TS/TT-Gemischs entstehen in den Nachweisreaktionen folgende Äquivalente Thiocyanat aus TT und TS:

1. TT-Nachweis:  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-} \equiv 1 \text{ SCN}^-$
2. TS-Nachweis:  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-} \equiv 2 \text{ SCN}^-$ ;  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \equiv 1 \text{ SCN}^-$

Beim TT-Nachweis werden also ein Äquivalent und beim TS-Nachweis drei Äquivalente Thiocyanat gebildet.

In zwei Reaktionsgefäßen wurden jeweils 50 µl der zu analysierenden Probe mit 150 µl NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH-Puffer (100 mM, pH 7,4) und 300 µl Wasser gemischt und auf 4°C abgekühlt. Für die Nachweisreaktion von TT wurden im Reaktionsgefäß 1 250 µl Kaliumcyanid (0,1 M, 4°C) hinzugegeben, gemischt und 20 min bei 4°C inkubiert. Für den Nachweis von TS wurden im Reaktionsgefäß 2 250 µl KCN (0,1 M, 4°C) hinzugegeben, gemischt und 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 75 µl Kupfersulfat (0,1 M, 4°C) hinzupipettiert, gemischt und weitere 10 min bei 4°C inkubiert. Abschließend wurden bei beiden Nachweisen 150 µl Eisen(III)-nitrat (1,5 M, 4°C) in 4 M Perchlorsäure dazugegeben und unter Schütteln auf 25°C erwärmt. Die entstehende Färbung des Eisenthiocyanats wurde photometrisch bei 460 nm gemessen. Als Referenz wurde Wasser verwendet.

Die TT-Konzentration ergab sich aufgrund der gebildeten Äquivalente Thiocyanat direkt aus der gemessenen Absorption beim TT-Nachweis. Die TS-Konzentration ergab sich aus der Subtraktion des zweifachen TT-Absorptionswertes von der Absorption, die beim TS-Nachweis gemessen wurde.

Für die TS- und TT-Konzentrationsbestimmungen wurden TS/TT-Standardreihen mit den in Tabelle 4 angegebenen Konzentrationen erstellt. Zur Kontrolle der Stabilität

von TT und TS unter den Bedingungen des TTH-Aktivitätstests wurden bei RT Standardreihen in Wasser, in Wasser mit 1 mM Magnesiumchlorid und in 50 mM Ameisensäure (pH 3) angesetzt. Zusätzlich wurden die Standards einer Reihe in Ameisensäure und 1 mM Magnesiumchlorid für 5 Stunden bei 95°C inkubiert. Die Nachweisreaktionen für TS und TT wurden mit jedem Ansatz der Standardreihen durchgeführt.

**Tab. 4:** Konzentrationen der TS/TT-Standards

ST Nr.*	1	2	3	4	5	6	7
TT [mM]	0	0,0	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0
TS [mM]	0	2,0	1,75	1,5	1,0	0,5	0,0

\*ST Nr.: Nummer des Standards

### 3.17.5.2 Aktivitätstest

Um Tetrathionat-Hydrolase (TTH)-Aktivität zu messen, wurden 130 µg Protein der Fraktion „TTH DE1“ mit 1,8 mM Tetrathionat (TT) in Reaktionspuffer (50 mM Ameisensäure, pH 3, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) eine Stunde unter konstantem Schütteln bei 80°C in einem Volumen von 1 ml inkubiert (nach Bugaytsova & Lindström, 2004, verändert). Nach 0, 10, 30 und 60 min wurde jeweils eine 100 µl Probe entnommen, auf Eis abgekühlt, um die Reaktion zu stoppen, und bei 4°C solange aufbewahrt, bis die TT und Thiosulfat (TS) Konzentrationen durch Cyanolyse bestimmt wurden. Als Kontrolle wurde parallel dazu ein Ansatz mit Puffer (40 mM KP<sub>i</sub>, pH 6,5; 0,5 M NaCl) anstelle des Proteinextrakts inkubiert und die TT und TS Konzentrationen zu den gleichen Zeitpunkten bestimmt.

Um auszuschließen, dass der gemessene TT Verbrauch auf eine TQO-Rückreaktion zurückzuführen war, wurden als Kontrollen TTH-Aktivitätstests mit gereinigter TQO (10 und 20 µg) und TQO-Aktivitätstests (3.16.1) mit TTH-Proteinextrakten durchgeführt.

Außerdem wurde überprüft, ob *A. ambivalens* unter aeroben oder anaeroben Bedingungen TTH synthetisiert, wenn es mit S<sup>0</sup> als Substrat wächst. Hierfür wurden TTH-Aktivitätstests mit jeweils 250 µg der cytoplasmatischen und der Membranfraktion durchgeführt. Zusätzlich wurde untersucht, ob entweder aerob, ohne Schwefel kultiviertes *Sulfolobus solfataricus* P1 oder aerob, mit Schwefel kultiviertes *Sulfurisphaera* sp. MC1 TTH produziert. Hierfür wurden TTH-Aktivitätstests mit jeweils 250 µg der Zellextrakte, der cytoplasmatischen und der Membranfraktionen durchgeführt.

Um auszuschließen, dass der bei den TTH-Aktivitätstests gemessene TT-Verbrauch vollständig oder teilweise auf niedermolekulare Substanzen zurückzuführen war, wurde der Puffer der Fraktion „TTH Q-Seph. HF“ mit einem Nanosep30K Mikrokonzentration (Ausschlussvolumen 30 kDa) ausgetauscht. Hierfür wurden 500 µl der Fraktion mit dem Konzentration solange bei 7000 rpm zentrifugiert, bis das Fraktionsvolumen 50 µl war. Anschließend wurde die Fraktion mit Puffer (40 mM KPi, pH 6,5) auf 400 µl aufgefüllt. Die Konzentration und Pufferzugabe erfolgte insgesamt dreimal hintereinander. Hierauf wurden die TTH-Aktivitäten und die Absorptionsspektren der Ausgangsfraktion, des ersten Filtrats und des Konzentrats gemessen.

Um auszuschließen, dass die TTH-Aktivität auf DNA- oder RNA-Moleküle zurückzuführen war, wurden jeweils 100 µl der Fraktion „TTH MQ2“ (jeweils 12,5 µg Protein) mit Proteinase K (2 µg/ml), DNase II (10 µg/ml), DNase I (10 U), RNase A (12,5 µg/ml) oder H<sub>2</sub>O für eine Stunde bei 37°C in Proteinpuffer mit 5 mM MgCl<sub>2</sub> inkubiert und anschließend die TTH-Aktivität gemessen. Außerdem wurden TTH-Aktivitätstests mit der für die Northern-Analyse isolierten RNA durchgeführt (Kap. 3.18.2).

### **3.17.5.3 Wirkungstest verschiedener Substanzen auf die TTH-Aktivität**

Die Wirkung verschiedener Substanzen auf die Aktivität der TTH wurde getestet. Dazu wurden TTH-Aktivitätstests mit jeweils 135 µg Protein der Fraktion „TTH DE1“ und jeweils 1 mM Magnesiumchlorid, 1 mM Zinksulfat oder 1 M Ammoniumsulfat durchgeführt und mit der TTH-Aktivität ohne Zusatz einer dieser Substanzen verglichen.

Jeweils 20 µg Protein der Fraktion „TTH MQ“ wurden mit 1% SDS oder Wasser 5 min bei 65°C inkubiert. Eine Vorinkubation der TTH mit 18% Saccharose und 10 mM EDTA wurde bei der Spheroplastierung von *Acidianus ambivalens* Zellen durchgeführt (3.3.3). Außerdem wurde jeweils 15 µg Protein der Fraktion „TTH MQ2“ mit 4 µM PQQ (Pyrrolochinolin-Chinon) oder H<sub>2</sub>O 20 Tage bei 4°C inkubiert. Nach jeder Inkubation wurde die TTH-Aktivität gemessen.

### **3.17.6 NADH-DH Aktivitätsmessung mit Kaliumhexacyanoferrat(III)**

Die NADH-DH Aktivität wurde photometrisch mit Kaliumhexacyanoferrat(III) (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) als Elektronenakzeptor bei 420 nm und 50°C gemessen. Als Substrat

wurde 0,2 mM NADH und als Reaktionspuffer 20 mM  $\text{KPi}$ , pH 6,5; 1,25 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 0,1 % DM verwendet. Die Durchführung entsprach der TQO-Aktivitätsmessung mit  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (Gomes *et al.*, 2001a; siehe auch 3.16.1).

### 3.17.7 Schwefel-Oxygenase/-Reduktase (SOR)

Um SOR Aktivität zu messen, wurden 100  $\mu\text{g}$  Proteinfraction in Reaktionspuffer (70 mM Tris/HCl; pH 7,2; 0,1% Tween 20; 2% (w/v) Schwefel durch Ultraschall fein verteilt) 30 min unter konstantem Schütteln bei 80°C in einem Volumen von 1,5 ml inkubiert. Nach 0, 15 und 30 min wurde jeweils 250  $\mu\text{l}$  Probe entnommen, die Reaktion auf Eis gestoppt und  $\text{S}^0$  durch Zentrifugation sedimentiert. Die Thiosulfat (TS)-Konzentrationen in den Proben wurden mit Methylblau bestimmt (nach Pachmair, 1960). Die Einheit Unit wurde definiert als die Bildung von einem Mikromol TS in einer Minute.

#### Thiosulfatnachweis

Der Nachweis beruht auf der Entfärbung von Methylblau durch TS. Hierfür wurden jeweils 750  $\mu\text{l}$  Methylblaulösung (12 mg/l Methylblau, 5 M HCl) mit einer 250  $\mu\text{l}$  Probe des SOR-Tests gemischt. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei RT wurde die Absorption der Proben bei 670 nm gemessen. Die TS-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einer Standardreihe von 0,625 bis 5 mM TS.

### 3.17.8 Pyrophosphatase-Aktivitätstest

Um Pyrophosphatase-Aktivität zu messen, wurden 30  $\mu\text{g}$  Protein der Fraktion „TTH MQ“ in 20 mM Tris/HCl (pH 6,7) Puffer oder jeweils 50  $\mu\text{g}$  Protein der Fraktionen „TTH Q-Seph. HF“, „TTH Q-Seph. NF“, „F2 Q-Seph.“ oder Wasser in Reaktionspuffer (40 mM Acetat, 40 mM Imidazol, 40 mM Tris, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM  $\text{NA}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , pH 7,5 mit NaOH) eine Stunde unter Schütteln bei 70°C in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu\text{l}$  inkubiert (nach Richter & Schäfer, 1992). Nach 0, 10, 30 und 60 min wurde jeweils 80  $\mu\text{l}$  Probe entnommen und die Phosphat Konzentrationen mit Malachitgrün bestimmt (nach Baykov *et al.*, 1988).

#### P<sub>i</sub>-Bestimmung mit Malachitgrün

60 ml konzentrierte Schwefelsäure wurden langsam in 300 ml Wasser gegeben und nach Abkühlung der Lösung auf RT 0,44 g Malachitgrün hinzugegeben. Die somit gebildete orangefarbene Lösung war bei RT für 1 Jahr stabil. Vor der Pi-Bestimmung am Tag der Verwendung wurden 10 ml der Lösung mit 2,5 ml 7,5% Ammonium-

Molybdat und anschließend mit 0,2 ml 11% Tween20 gemischt. 20 µl der Farbreagenz wurden mit 80 µl der zu analysierenden Probe gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 630 nm. Die P<sub>i</sub>-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einer geeigneten Phosphat Standardreihe.

### **3.17.9 Aktivitätsmessungen mit einer Sauerstoffelektrode**

#### **(Suche nach neuen Enzymaktivitäten des oxidativen Schwefelstoffwechsels)**

Um zu untersuchen, ob bei der Zugabe von Thiosulfat (TS) zur Membranfraktion (MF) eine Reduktion von Sauerstoff stattfindet, wurden Messungen mit einer Sauerstoffelektrode (5300 Biological Oxygen Monitor, Yellow-Springs Instruments) durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 70°C jeweils in einem Reaktionsvolumen von 1,3 ml. Ein Reaktionsansatz enthielt 47 mM BisTris Puffer (pH 6) und 2,3 mg Gesamtprotein der Membranfraktion (MF). Nach 3 min Inkubation wurden 10 mM Thiosulfat (TS) und nach 6,7 min 18 µM KCN, ein Inhibitor der terminalen Chinol-Oxidase, hinzugegeben. Als Kontrolle wurde Puffer (40 mM KPi, pH 6,5, 0,1% DM) statt TS verwendet oder die Reihenfolge der Substrat- und Proteinzugaben geändert.

Um weitere Enzyme des oxidativen Schwefel- und Energiestoffwechsels von *Acidianus ambivalens* zu finden, die die Oxidation von Schwefelverbindungen mit der Sauerstoffreduktion koppeln, wurden Messungen in einem Reaktionsvolumen von jeweils 2 ml mit 0,75 bis 3 mg Protein der cytoplasmatischen oder Membranfraktion und jeweils einem der schwefelhaltigen Substrate Tetrathionat (0,5 bis 5 mM), Natriumsulfit (0,5 bis 5 mM), Natriumsulfid (Na<sub>2</sub>S; 0,25 bis 2 mM) oder mit jeder möglichen Kombination dieser Substrate und Fraktionen bei 50°C entsprechend den Messungen mit TS durchgeführt.

Zur Kontrolle, ob die Na<sub>2</sub>S-abhängige Sauerstoffreduktion durch die MF enzymatisch bedingt war, wurden jeweils 1,5 mg Gesamtprotein der MF mit 0,2 µg Proteinase K oder Wasser bei 37°C für eine Stunde in Proteinpuffer inkubiert und anschließend jeweils die Aktivität gemessen. Die Messungen erfolgten bei 50°C mit 0,5 mM Na<sub>2</sub>S. Außerdem wurde untersucht, ob die Na<sub>2</sub>S-abhängige, durch die MF katalysierte Sauerstoffreduktion durch Kaliumcyanid (KCN) oder die Chinonanaloga Stigmatellin oder HQNO (Heptylhydroxyquinoline-N-oxide) inhibiert wird. Diese wurden entweder direkt während einer Messung in den Reaktionsansatz hinzugegeben oder die MF wurde zuvor damit inkubiert. Hierfür wurde jeweils 0,5 mM Na<sub>2</sub>S verwendet. Die



Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  1 mM KCN (Endkonzentration 10  $\mu\text{M}$ ) erfolgte 80 Sekunden nach dem Reaktionsstart mit 3 mg Gesamtprotein der MF und eine weitere Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  1 mM KCN (Endkonzentration 25  $\mu\text{M}$ ) nach 138 Sekunden. Die Zugabe von 125  $\mu\text{M}$  Stigantellin erfolgte 2,4 min nach dem Reaktionsstart mit 1,2 mg Protein der MF. 100  $\mu\text{M}$  HQNO wurden mit 3 mg Protein der MF für 16 Stunden bei 4°C und danach zusätzlich mit 500  $\mu\text{M}$  HQNO für 15 min bei RT inkubiert.

Da Schwefelwasserstoff die terminale Oxidase reduziert (Tiago Bandejas, 2005), wurden Aktivitätsmessungen mit gereinigter terminaler Oxidase und Natriumsulfid entsprechend den Messungen mit  $\text{Na}_2\text{S}$  und MF durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine Sauerstoffreduktion stattfindet. Hiefür wurde 16  $\mu\text{g}$  gereinigte terminale Oxidase verwendet. Außerdem wurde jeweils 0,4 mg Protein der MF 6 min nach dem Reaktionsstart mit 16 oder 24  $\mu\text{g}$  terminaler Oxidase hinzugegeben.

### **3.18 Biochemische Charakterisierungen**

#### **3.18.1 Temperaturabhängigkeit der TQO**

Um die Temperaturabhängigkeit der TQO zu untersuchen, wurde die Aktivität mit Kaliumhexacyanoferrat(III) bei 20, 24, 30, 34, 39, 44, 49, 53, 58, 62, 66, 71, 76, 80, 85, 89 und 92°C gemessen (siehe 3.16.1). Für jeden Reaktionsansatz wurden jeweils 9  $\mu\text{g}$  TQO eingesetzt.

#### **3.18.2 Bestimmungen der TQO $K_M$ -Werte für DQ und $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$**

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstante ( $K_M$ ) für DQ wurden TQO Reaktionsgeschwindigkeiten ( $v_0$ ) bei verschiedenen DQ-Konzentrationen im Bereich von 1 bis 32  $\mu\text{M}$  bei 80°C gemessen und für  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  bei verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 0,1 bis 1,3 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  ebenfalls bei 80°C. Pro Reaktion wurden 9  $\mu\text{g}$  TQO eingesetzt. Zur Bestimmung der  $K_M$ -Werte erfolgte jeweils eine graphische Analyse im Lineweaver-Burk-Diagramm.

#### **3.18.3 Temperatur- und pH-Abhängigkeit der TTH**

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der Tetrathionat-Hydrolase (TTH) wurden Aktivitätstests bei 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 95°C durchgeführt. Eine Aktivitätsmessung bei einer Temperatur über 95°C war technisch nicht möglich. Pro Reaktion wurden 130  $\mu\text{g}$  Protein der Fraktion „TTH DE1“ eingesetzt.

Für die Bestimmung des pH-Optimums wurden Aktivitätstests bei 80°C und den pH Werten 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 durchgeführt. Der pH-Wert wurde mit HCl bzw. KOH eingestellt. Für jeden Reaktionsansatz wurden jeweils 20 µg Protein der Fraktion „TTH MQ2“ verwendet.

#### **3.18.4 Bestimmung der kinetischen Konstanten der TTH**

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstante ( $K_M$ ) der Tetrathionat-Hydrolase (TTH) wurden Reaktionsgeschwindigkeiten ( $v_0$ ) bei den TT-Konzentrationen 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 und 4 mM bei 80°C in 50 mM Ameisensäure (pH 3) mit 1 mM  $MgCl_2$  gemessen. Pro Reaktion wurden 10 µg Protein der Fraktion „TTH MQ“ eingesetzt. Zur Bestimmung von  $K_M$  und  $V_{max}$  erfolgte eine graphische Analyse im Lineweaver-Burk-Diagramm.

#### **3.18.5 Bestimmung der kinetischen Konstanten der $S^{2-}$ -abhängigen Sauerstoffreduktion durch die Membran**

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstante ( $K_M$ ) der  $S^{2-}$ -oxidierenden Aktivität der Membran wurden Reaktionsgeschwindigkeiten ( $v_0$ ) des  $S^{2-}$ -abhängigen Sauerstoffverbrauchs bei den Natriumsulfid-Konzentrationen 0,25; 0,5 und 2 mM bei 50°C in 47 mM BisTris Puffer (pH 6) mit einer Sauerstoffelektrode gemessen. Pro Reaktion wurde jeweils 1 mg Gesamtprotein der MF eingesetzt. Zur Bestimmung von  $K_M$  und  $V_{max}$  erfolgte eine graphische Analyse im Lineweaver-Burk-Diagramm.

### **3.19 DNA und RNA Analysen**

#### **3.19.1 Southern-Analyse**

Für die Detektion von *doxDA*-Genen wurde genomische DNA von *Acidianus* jeweils mit den Restriktionsenzymen BamH I, EcoR I, Hind III, Nhe I, Pst I und Xba I hydrolysiert, und die Fragmente in einem 1%igen Agarosegel in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA) elektrophoretisch aufgetrennt (1,5 µg/Spur). Anschließend wurde die DNA mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) gefärbt, unter UV-Licht (312 nm) photographiert und mit Wasser wieder entfärbt. Zur partiellen Depurinierung der DNA wurde das Gel 10 min in 0,25 M HCl geschwenkt, zur anschließenden Denaturierung 25 min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl und abschließend zum Neutralisieren 25 min in 1,5 M NaCl/0,5 M Tris/HCl (pH 7,5). Der Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte über Nacht mittels

Kapillarblot (Southern, 1975; Sambrook & Russel, 2001). Als Transferpuffer wurde 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat pH 7,0) verwendet. Durch zweistündige Inkubation bei 80°C wurden die DNA-Fragmente kovalent an die Membran gebunden. Für die Detektion wurde eine Digoxigenin markierte und frisch denaturierte *doxDA*-DNA-Sonde verwendet (1143 Nukleotide; Albrecht, 2004). Hierauf erfolgte eine Vorhybridisierung (2 h, 42°C) und anschließend die Hybridisierung (üN, 42°C) der Membran. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mit dem DIG Luminescent Detection Kit nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics, Mannheim). Als DNA Größenstandards wurden #SM0331 (MBI Fermentas) und #SM0191 (Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, 3; MBI Fermentas) verwendet.

### 3.19.2 Northern-Analyse

#### 3.19.2.1 Isolierung von RNA

Um zu untersuchen, ob ein Transkript der *doxDA*-Gene (TQO) bei verschiedenen Wachstumsbedingungen gebildet wird, wurde Gesamt-RNA aus *Acidianus* isoliert und eine Northern-Analyse mit einer *doxDA*-DNA-Sonde (Albrecht, 2004) durchgeführt (nach Sambrook & Russel, 2001). Außerdem wurde versucht, die Transkriptgröße zu bestimmen.

*Acidianus* wurde in 15 l Fermentern anaerob mit Schwefel (S<sup>0</sup>) oder aerob mit Tetrathionat (TT), aerob mit S<sup>0</sup> oder aerob mit S<sup>0</sup>/TT kultiviert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden jeweils 3 l entnommen und zentrifugiert (8000 rpm, GS 3, 10 min), bei der Kultivierung mit S<sup>0</sup>/TT zusätzlich auch nach 96 Stunden. Das Zellsediment wurde in 1 ml Lysepuffer (4 M Guanidiumthiocyanat, 30% Laurylsarcosyl, 1 mM β-Mercaptoethanol, 25 mM Natriumcitrat, pH 7, H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>) resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl 2 M Natriumacetat (pH 4,0), 1 ml Aqua-Phenol (Roth, Karlsruhe) und 210 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) wurde der Ansatz 10 Sekunden gemixt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 20 Minuten zentrifugiert (Sorvall, 10 000 rpm, SS34). Zur wässrigen Phase wurde 1 ml Isopropanol gegeben und der Ansatz 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz erneut 20 Minuten zentrifugiert (10.000 rpm, 4°C, Beckmann). Das Sediment wurde mit 300 µl Denaturierungspuffer (4 M Guanidiumthiocyanat, 30% Laurylsarcosyl, 25 mM Natriumcitrat, pH 7, H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>) versetzt und 10 min bei 56°C unter konstantem Schütteln inkubiert. Nach Extraktion mit 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

(24:1:25) wurde der Ansatz 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (13 000 rpm, Eppendorf). Zur wässrigen Phase wurden 300 µl Chloroform zugegeben und üN bei – 20°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (13 000 rpm, Eppendorf). Das Sediment wurde in Ethanol gewaschen, getrocknet und in geeigneter Menge H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> (50-100 µl) gelöst.

Die RNA Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Eine optische Dichte bei 260 nm von 1 entsprach 30 µg RNA/ml (Lottspeich & Zorbas, 1998).

Zur Prüfung der Qualität der RNA anhand der Schärfe der 16S und 23S Banden wurden 2 µl der RNA-Präparation mit 8 µl denaturierendem RNA-Mix (250 µl deionisiertes Formamid, 83 µl 37% Formaldehyd, 50 µl 10x MOPS-Gelpuffer pH 7,0 (400 mM MOPS, 100 mM Na-Acetat, 20 mM EDTA) 50 µl 6x DNA-Auftragspuffer pH 8 (30% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencylamol, 50 mM EDTA)) gemischt, 10 min bei 65°C denaturiert und elektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Hierauf wurden eine fünfminütige Färbung der RNA mit Toluidinblau (0,1% Toluidin, 20% (v/v) Ethanol in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) und eine Entfärbung des Gels mit 20% Ethanol durchgeführt.

### 3.19.2.2 Northern-Blot

Jeweils 5 µg RNA wurden in einem denaturierenden, formaldehydhaltigen, 1,2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Gelauftragspuffer wurde dabei RNA-Mix verwendet (Kap. 3.18.2.1). Der Transfer der RNA erfolgte mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran mit 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat, pH 7,0) als Transferpuffer (Ausubel *et al.*, 1988). Die transferierte RNA wurde durch zweistündige Inkubation bei 80°C und UV-Licht Einwirkung (Cross linking, Stratalinker<sup>®</sup> 1800) kovalent an die Membran gebunden. Durch Färbung der Membran mit Methylenblau (0,04% (w/v) Methylenblau, 0,5 M Natriumacetat, pH 5,5), konnte die Qualität und Quantität der RNA anhand der Bandenschärfe beurteilt werden. Die Membran wurde anschließend in H<sub>2</sub>O wieder entfärbt. Die Vorhybridisierung erfolgte für 2 h bei 42°C in Hybridisierungslösung (50% deionisiertes Formamid, 1% SDS, 10% Dextransulfat, 1x SSPE, 0,5% Magermilchpulver). Die Digoxigenin-markierte DNA-Sonde (Allbrecht, 2004) wurde bei 95°C für 3 min denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C üN. Anschließend wurde die Membran dreimal mit 0,2 x SSC/0,1% SDS jeweils für 30 min bei 55°C

gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem DIG Luminescent Detection Kit nach den Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics, Mannheim).

### **3.20 Sequenzanalysen von DoxD und DoxA bzw. *doxD* und *doxA***

Die N-terminale Aminosäuresequenz der 28 kDa Untereinheit (DoxA) alleine und DoxA und DoxD zusammen wurden mit Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken durch die Anwendungen BLASTP und TBLASTN verglichen, um Homologe zu identifizieren. Die *Acidithiobacillus ferrooxidans doxDA* Gene wurden in der bis jetzt unveröffentlichten Genomsequenz identifiziert (zur Verfügung gestellt von: Institute of Genome Research; Tigr; <http://www.tigr.org>). Die *Bacteroides fragilis doxDA* Gene wurden mit den BLAST Anwendungen des Sanger Institutes identifiziert (<http://www.sanger.ac.uk>). Die DoxD und DoxA Aminosäuresequenzen wurden bei Bedarf vor dem Sequenzvergleich mit den Programmanwendungen PILEUP, CLUSTALW und HMMERALIGN aus dem Wisconsin Packet (Accelrys) fusioniert. Die phylogenetische Analyse wurde mit dem Resultat aus dem vielfachen Sequenzvergleich mit den Programmen DISTANCES, GROWTREE, PAUPSEARCH und PAUPDISPLAY aus dem GCG Packet mit den vollständigen Sequenzen des Vergleichs und den DoxD und DoxA Domänen jeweils getrennt voneinander durchgeführt. Die Programme zur Vorhersage der Sekundärstruktur PSIPRED, MEMSAT (für einzelne Sequenzen) und DSC (für einzelne Sequenzen und den vielfachen Sequenzvergleich) verfügbar auf dem *expasy* Server (<http://us.expasy.org>) wurden für die Vorhersage der helicalen und  $\beta$ -faltblatt Regionen verwendet. Die Gebrauchsvorschriften für die Anwendungen waren auf der Webseite der PFAM Datenbank (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) vorhanden. Die Vorhersagen wurden in den löslichen und den transmembranen Teilen des Proteins (TQO) getrennt voneinander durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

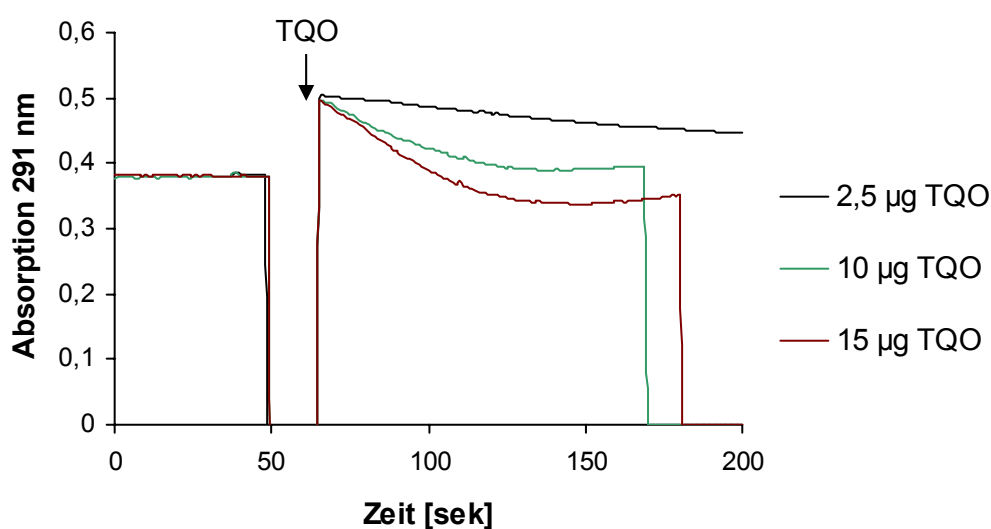
*Acidianus ambivalens* oxidiert unter aeroben Bedingungen Schwefel oder Tetrathionat (TT) über verschiedene Zwischenprodukte zu Sulfat. Die Produkte des ersten Enzyms im Schwefelstoffwechsel, die Schwefel-Oxygenase/-Reduktase, sind Sulfid ( $S^{2-}$ ) und Sulfit ( $SO_3^{2-}$ ). Das entstandene Sulfit reagiert nicht-enzymatisch mit elementarem Schwefel zu Thiosulfat, welches die Thiosulfat-Chinon-Oxidoreduktase (TQO) zu TT oxidiert. Die Ergebnisse der Reinigung und eine Teilcharakterisierung der TQO sind in meiner Diplomarbeit beschrieben (Müller, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde die TQO weitergehend charakterisiert. Außerdem wurde versucht andere Enzyme des aeroben Schwefelstoffwechsels zu reinigen, welche  $S^{2-}$  und TT katalytisch umsetzen.

### 4.1 Thiosulfat-Chinon-Oxidoreduktase (TQO)

#### 4.1.1 Aktivität der TQO mit DQ, $K_3Fe(CN)_6$ und Cyt c

Um zu untersuchen, ob die TQO Chinon reduziert, wurden photometrische Aktivitätstests mit Decylubichinon (DQ) bei  $80^\circ C$  durchgeführt. Die Reduktion von DQ wurde bei 291 nm als Absorptionsabnahme gemessen (Abb. 7). Die Aktivität erhöhte sich proportional zur Menge der TQO und betrug 5,8 mU mit 2,5  $\mu g$  TQO, 23,2 mU mit 10  $\mu g$  TQO und 37,2 mU mit 15  $\mu g$  TQO (Tab. 5, Abb. 7). Die durchschnittliche spezifische Aktivität betrug  $2,4 \pm 0,08$  U/mg.



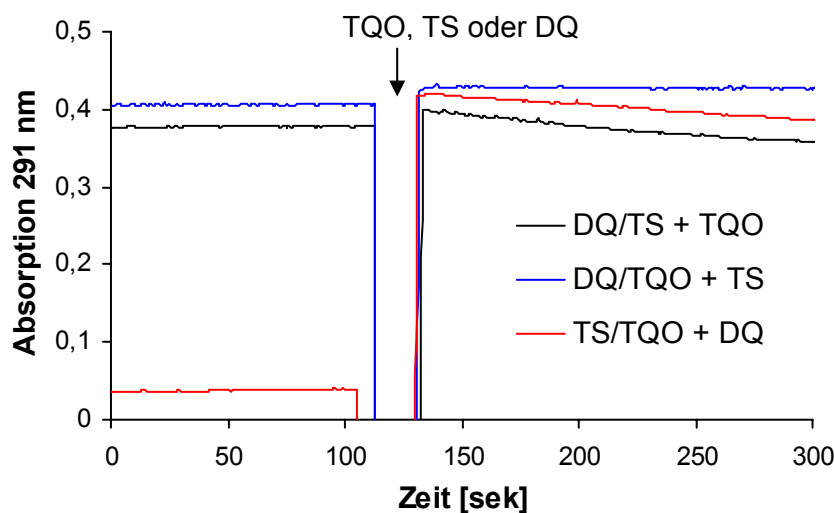
**Abb. 7:** TQO Aktivitätsmessungen mit DQ und verschiedenen Mengen der TQO. Pfeil: Zugabe der TQO.

**Tab. 5:** TQO-Aktivitäten mit Decylubichinon

TQO [ $\mu\text{g}$ ]	dA/min*	Aktivität [mU]	Spezifische Aktivität [U/mg]
2,5	-0,029	5,8	2,32
10	-0,117	23,2	2,32
15	-0,187	37,2	2,48

\*dA/min: Absorptionsänderung pro Minute

Als Kontrolle wurden verschiedene Reihenfolgen der Zugaben der Substrate und der TQO getestet (Abb. 8). Es wurde jeweils keine Hintergrundsreaktion bei der Inkubation von je 2 der 3 Reaktanden (DQ, TS, TQO) gemessen (0-125 Sekunden; Abb. 8). Bei der Inkubation von DQ mit der TQO und anschließender Zugabe von Thiosulfat (TS) wurde keine Aktivität gemessen. Im Gegensatz dazu wurde Aktivität gemessen, nachdem DQ mit TS bzw. TS mit der TQO inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von TQO bzw. DQ gestartet wurde (Abb. 8). Nachdem die Reaktion beendet war, wurde außerdem DQ durch Zugabe von Natriumborhydrid weiter reduziert (nicht gezeigt). Daraus wurde geschlossen, dass Decylubichinon fest an die TQO gebunden hatte, und so ein normaler Substratumsatz verhindert wurde.

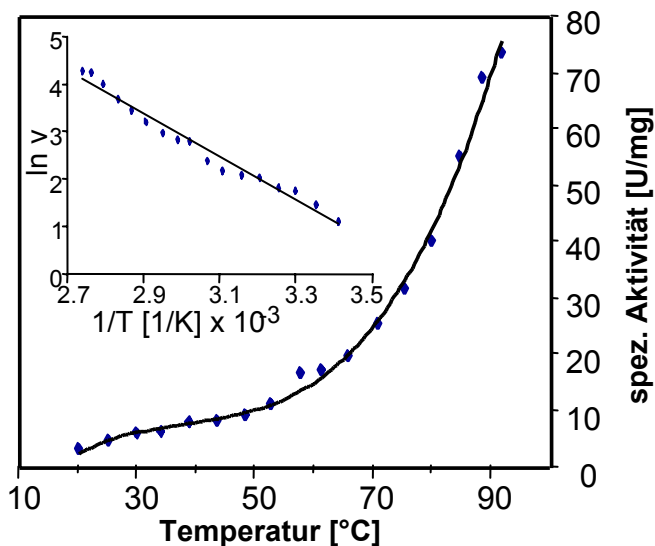


**Abb. 8:** Photometrische TQO-Aktivitätsmessungen mit DQ bei 291 nm. DQ: Decylubichinon, TQO: Thiosulfat-Chinon-Oxidoreduktase, TS: Thiosulfat. Nach 125 Sekunden erfolgte jeweils die Zugabe des 3. Reaktanden.

Zum Vergleich: Die spezifische Aktivität mit Kaliumhexacyanoferrat(III) ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) als Elektronenakzeptor betrug bei  $80^\circ\text{C}$   $48 \text{ U (mg TQO)}^{-1}$  (Müller, 2003). Bei der Verwendung von Cytochrom c wurde keine Aktivität gemessen. Die TQO reduzierte Cytochrom c also nicht.

### 4.1.2 Temperatur- und pH-Abhängigkeit der TQO

Die spezifische TQO-Aktivität mit  $K_3Fe(CN)_6$  wurde bei verschiedenen Temperaturen im Bereich von 20 bis 92°C bestimmt (Abb. 9). Die Enzymaktivität stieg mit Erhöhung der Temperatur und betrug maximal 73 U (mg TQO)<sup>-1</sup> bei 92°C. Ein Maximum konnte aus technischen Gründen nicht bestimmt werden. Die aus dem Arrhenius Plot berechnete Aktivierungsenergie lag bei 37,7 kJ mol<sup>-1</sup> (Abb. 9).



**Abb. 9:** Temperaturabhängigkeit der TQO. Oben links eingefügt: Arrhenius Plot.

Für die TQO-Aktivität mit  $K_3Fe(CN)_6$  bei 80°C wurde ein pH-Optimum im Bereich von 4,8 bis 5 bestimmt (Müller, 2003).

### 4.1.3 $K_M$ -Werte für die TQO Elektronenakzeptoren DQ und $K_3Fe(CN)_6$ , sowie das Substrat TS

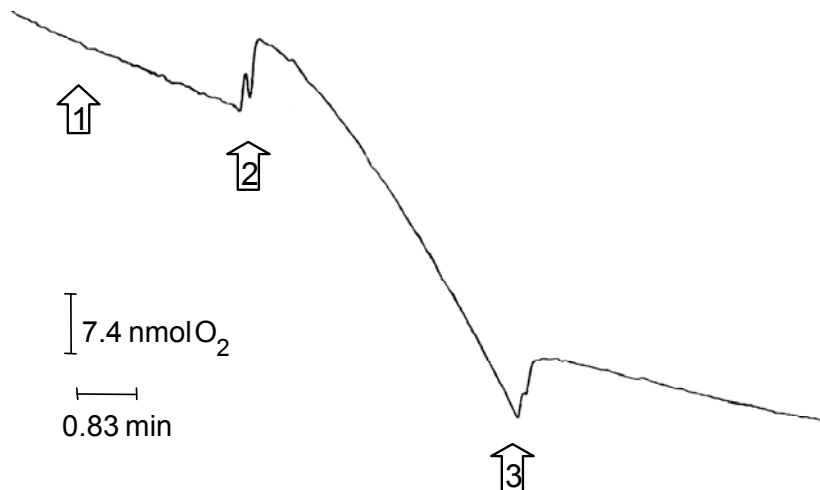
Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen DQ- und  $K_3Fe(CN)_6$  Konzentrationen und die graphischen Analysen durch Lineweaver-Burk-Diagramme ergaben die  $K_M$ -Werte von 5,87  $\mu M$  für DQ und 3,4 mM für  $K_3Fe(CN)_6$  (Diagramme nicht gezeigt). Der  $K_M$ -Wert für TS wurde zuvor in der Diplomarbeit bestimmt und betrug 2,6 mM TS (Müller, 2003). Die Umsatzrate ( $k_{cat}$ ) von TS bei einer Konzentration von 10 mM betrug 167 s<sup>-1</sup>, woraus sich eine Spezifitätskonstante von 64000 s<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> ergab (Müller 2003).

### 4.1.4 Kopplung der Thiosulfatoxidation mit der Sauerstoffreduktion

Der Sauerstoffverbrauch von intakter Membranfraktion von *A. ambivalens* wurde vor und nach der Zugabe von TS und nach anschließender Zugabe von KCN mit einer Sauerstoffelektrode gemessen (Abb. 10). Vor der Zugabe von TS betrug die Rate



des Sauerstoffverbrauchs  $1,7 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} (\text{mg Gesamtprotein})^{-1}$ . Die Rate erhöhte sich nach der Zugabe von TS auf das 4,5-fache und betrug maximal  $7,7 \text{ nmol O}_2 (\text{min mg Gesamtprotein})^{-1}$ . Nach der Zugabe von KCN sank die Rate des Sauerstoffverbrauchs auf  $0,9 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} (\text{mg Gesamtprotein})^{-1}$  bzw. 11,7% des maximalen Werts.

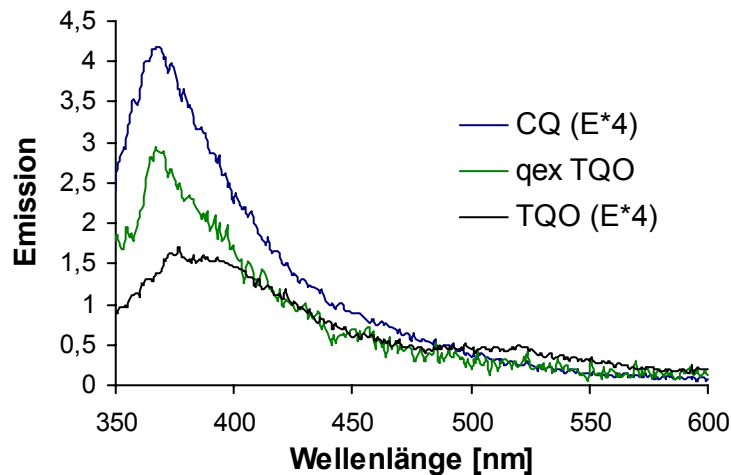


**Abb. 10:** Sauerstoffverbrauchsmessung von intakter Membranfraktion (2,32 mg Gesamtprotein; Pfeil 1) vor und nach der Zugabe von Thiosulfat (10 mM; Pfeil 2) und anschließender Zugabe von KCN (18  $\mu\text{M}$ ; Pfeil 3) bei 70°C in BisTris Puffer (pH 6).

Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass ein Elektronentransport von Thiosulfat auf Sauerstoff, katalysiert durch die TQO und die terminale Oxidase, stattfindet.

#### 4.1.5 Fluoreszenz Spektroskopie

Um zu untersuchen, ob Caldariella Chinon (CQ) Bestandteil der TQO ist, wurden Fluoreszenz Spektren von CQ, TQO und Chinonextrakt aus TQO, genannt „qex TQO“, bei einer Anregungswellenlänge von 330 nm und einer Emissionswellenlänge von 350 nm gemessen (Abb. 11). Die Emissionsmaxima der drei Spektren lagen im Bereich von 368 bis 370 nm. Die Spektren von CQ und „qex TQO“ hatten einen ähnlichen Verlauf. Das Spektrum der TQO wies zusätzlich Maxima bei 387 und 520 nm auf.

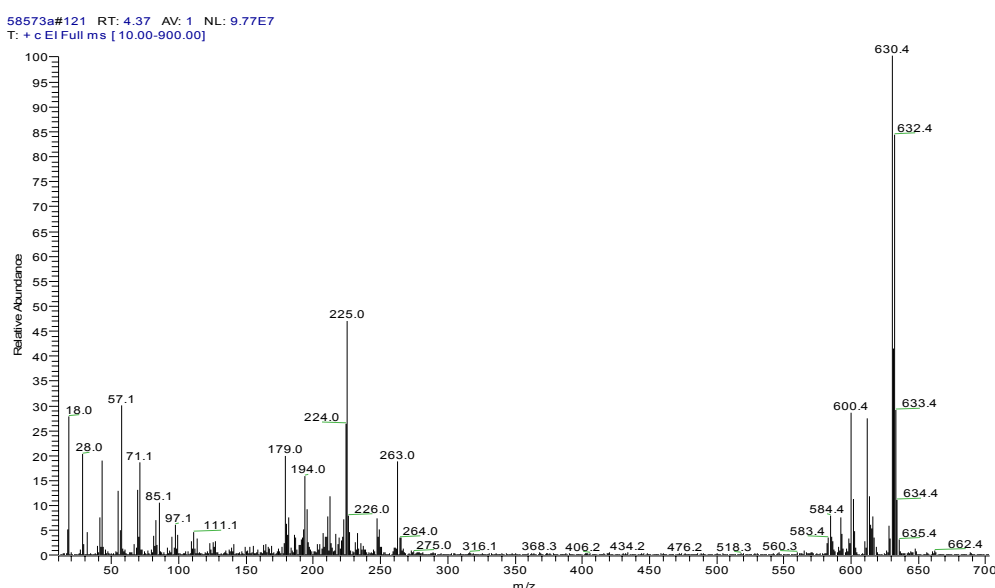


**Abb. 11:** Fluoreszenz Spektren. CQ (E\*4): Caldariella Chinon (Emission x 4), qex TQO: Chinonextrakt aus TQO, TQO (E\*4): Thiosulfat-Chinon-Oxidoreduktase (Emission x 4).

#### 4.1.6 Massenspektren der Chinonextrakte von TQO-Reinigungsfraktionen

Um die Chinon Cofaktoren der TQO zu identifizieren, wurden Massenspektren von den Chinonextrakten aus gereinigter TQO, aus der Membranfraktion und aus den TQO-aktiven Fraktionen der Reinigungszwischenschritte gemessen.

Das Massenspektrum des Chinonextraktes der gereinigten TQO zeigte Signale bei 630, 628 und in geringerer Intensität bei 598 und 592 (Abb. 12), die mit den Massen der Caldariella Chinone CQ-6(12H) und CQ-6(10H), dem Menachinon und dem Sulfolobus Chinon SQ-6(12H) übereinstimmten (Thurl *et al.*, 1986). Die Signale bei 615, 583, 225, 224, 212 und 179 entsprachen den Fragmentationen von CQ-6(12H).



**Abb. 12:** Massenspektrum des Chinonextraktes von gereinigter TQO.

Die Signale bei 613 und 263 entsprachen den Fragmentationen von CQ-6(10H). Die Signale bei 583, 193 und 192 entsprachen den Fragmentationen von SQ-6(12H). Die Signale der Fragmentationen von Menachinon waren bei 186 und 187.

Die Massenspektren der Chinonextrakte der anderen Fraktionen stimmten mit dem von gereinigter TQO überein. Daraus wurde geschlossen, dass die in der Membran von aerob gewachsenen Zellen enthaltenen Chinone an die TQO binden können.

#### **4.1.7 Chinongehalt der TQO**

Um den Chinongehalt der TQO zu bestimmen, wurden Absorptionsspektren von gereinigter TQO nach Hydroxyapatit- und Gelfiltrationschromatographie (S 200) und den Chinonextrakten aus diesen Fraktionen gemessen (Spektren nicht gezeigt). Aus dem Lambert-Beerschen Gesetz unter Benutzung des Extinktionskoeffizienten für Caldariella Chinon bei 460 nm ( $\epsilon_{CQ460} = 1137 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; T.M. Bandejas, persönliche Mitteilung) ergab sich ein Gehalt von 4 mol Chinon pro mol TQO nach Hydroxyapatit- und von 2 mol Chinon pro mol TQO nach Gelfiltrationschromatographie. Diese Ergebnisse deuteten in Übereinstimmung mit einer Abnahme der Absorption darauf hin, dass die Chinon-Cofaktoren sich während der Reinigung von der TQO lösten.

#### **4.1.8 Metallgehaltsbestimmung der TQO durch TXRF Analyse**

Zur Bestimmung von Cofaktoren wurde eine Metallgehaltsbestimmung von gereinigter TQO durch TXRF (Röntgenstrahlen-Fluoreszenzspektroskopie) Analyse durchgeführt. Die Mengen der bestimmten Metalle betragen 0,09 mol Ca, 0,05 mol Fe, 0,06 mol Cu und 0,07 mol Zn jeweils pro mol Holoenzym. Die Mengen aller anderen Metalle lagen unterhalb der Nachweisgrenzen. Da keine Metalle in stöchiometrischen Mengen vorlagen, wurde geschlussfolgert, dass die TQO außer Chinon keine zusätzlichen redox-aktiven Cofaktoren aufweist.

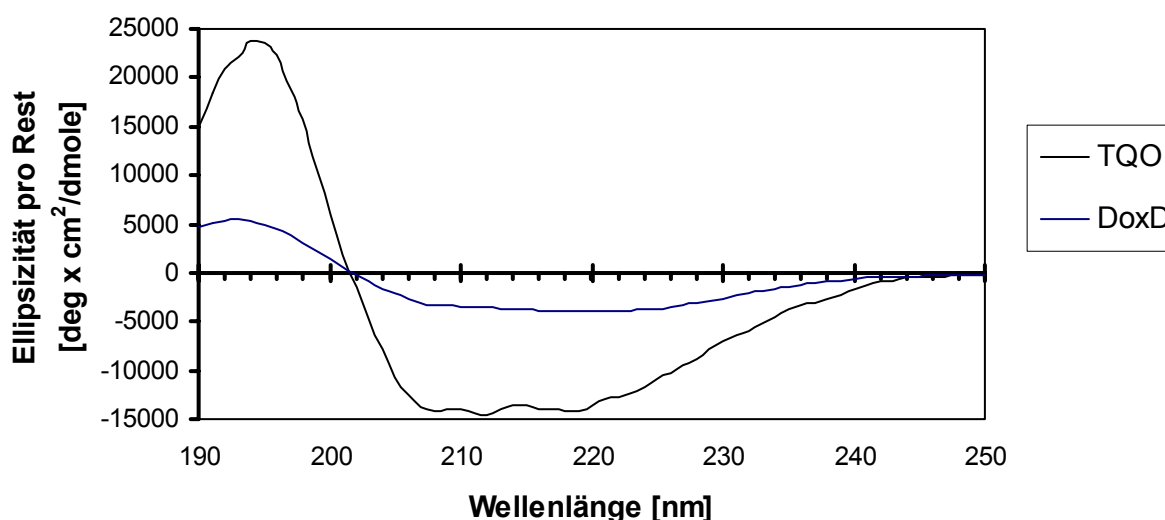
#### **4.1.9 Identifizierung der Untereinheiten der TQO**

Da eine N-terminale Sequenzierung vermutlich aufgrund einer Modifizierung des N-Terminus keine Ergebnisse brachte, erfolgte die Identifizierung der 16 kDa Untereinheit der TQO durch MALDI-TOF Analyse. Die Analyse der durch Trypsinolyse erhaltenen Fragmente ergab eine Übereinstimmung von 19 der 23 Fragmente mit den berechneten Fragmenten von DoxD. DoxD besteht aus 184 Aminosäuren und wurde als Untereinheit der terminalen Chinoloxidase beschrieben

(Purschke *et al.*, 1997). Die Fragmente schlossen die Aminosäurepositionen 5 bis 179 mit ein. Die aus der Sequenz kalkulierte Masse war 20,4 kDa und die apparente Masse im SDS-Polyacrylamidgel 16 kDa. Die 28 kDa Untereinheit der TQO (DoxA) war zuvor schon durch N-terminale Sequenzierung und Sequenzvergleich identifiziert worden (Müller, 2003). DoxA besteht aus 168 Aminosäuren und wurde ebenso schon als Untereinheit der terminalen Chinoloxidase beschrieben (Purschke *et al.*, 1997). Die aus der Sequenz kalkulierte Masse war 18,7 kDa und die apparente Masse im SDS-Gel 28 kDa.

#### 4.1.10 Sekundärstrukturanalyse der TQO durch CD-Spektroskopie

Um die Sekundärstruktur der TQO zu untersuchen, wurden CD Spektren des Holoenzym im Bereich von 190 bis 250 nm angefertigt. Das Maximum des Holoenzym lag bei 194 nm und das Minimum bei 212 nm (Abb. 13). Aus den Spektren wurde der Gehalt an  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern berechnet. Der durchschnittliche Gehalt der  $\alpha$ -Helices lag bei 46 (+/- 2)% mit einer durchschnittlichen Länge von 12 Aminosäureresten, der durchschnittliche Gehalt der  $\beta$ -Faltblätter bei 11,6 (+/- 0,6)% mit einer durchschnittlichen Länge von 5 Resten.



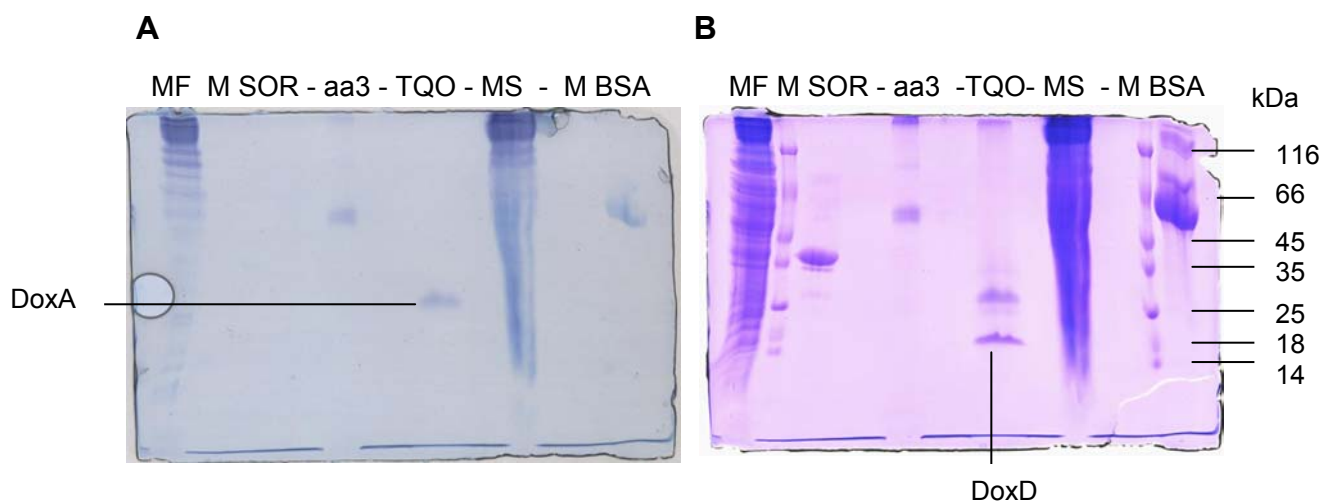
**Abb. 13:** Circular dichroismus Spektren des TQO Holoenzym und der Untereinheit DoxD. Die y-Achse repräsentiert die molare Elliptizität.

Bei der Reinigung war neben der aktiven auch eine inaktive Fraktion erhalten worden, die im SDS-Gel lediglich DoxD aufwies (Müller, 2003). Zum Vergleich wurden CD Spektren von dieser DoxD Fraktion im Bereich von 190 bis 250 nm gemessen. Das Maximum lag bei 192 nm und das Minimum bei 220 nm (Abb. 13). Der durchschnittliche alpha-helicale Gehalt von DoxD lag bei 35 (+/- 0,9)% mit einer

durchschnittlichen Länge von 15 Aminosäureresten, der durchschnittliche Gehalt der  $\beta$ -Faltblätter bei 16,2 (+/- 1,2)% mit einer durchschnittlichen Länge von 4 Resten.

#### 4.1.11 Nachweis einer Glycosylierung durch Färbung der TQO mit Alcianblau

Bei diesem Nachweis wurden die in einem SDS-Gel aufgetrennten Glycoproteine mit Periodsäure oxidiert und zum Abschluss durch Färbung mit Alcianblau nachgewiesen. Hiermit wurde untersucht, ob die Membranfraktion und die solubilierten Membranproteine von *A. ambivalens* glycosylierte Proteine enthalten, und ob die gereinigte TQO glycosyliert ist (Abb. 14 A). Nicht glycosylierte Proteine wurden nach der Alcianblau-Färbung durch Coomassie sichtbar gemacht (Abb. 14 B). Zum Vergleich wurden die terminale Oxidase, sowie die lösliche, cytoplasmatische SOR (Schwefel-Oxygenase/-Reduktase) von *A. ambivalens* verwendet (Abb. 14).



**Abb. 14:** SDS-Gel **A)** mit Alcianblau und **B)** mit Coomassie gefärbt. MF: Membranfraktion, M: Protein Marker (# SM0431), SOR: Schwefel-Oxygenase/-Reduktase, aa3: terminale Oxidase, TQO: Thiosulfat-Chinon-Oxidoreduktase, MS: Membransolubilisat, BSA: Rinderserumalbumin.

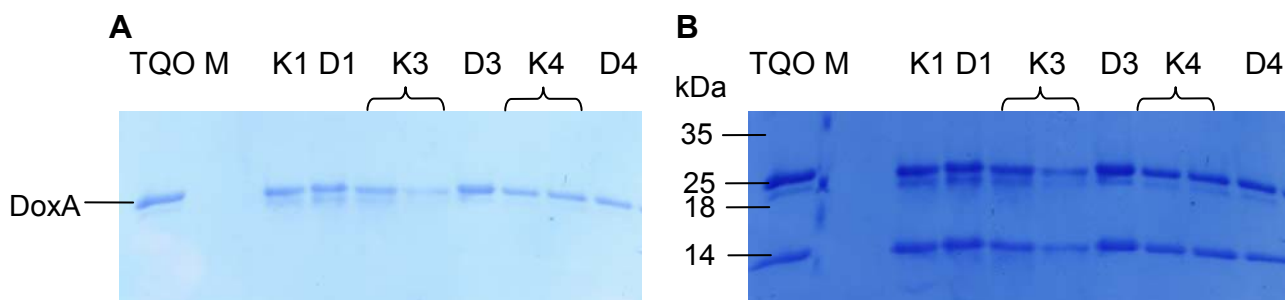
In der Membranfraktion und den solubilierten Membranproteinen waren viele glycosylierte Proteine vorhanden (Abb. 14 A). Bei der TQO wurde nur die Untereinheit DoxA und nicht DoxD durch Alcianblau gefärbt (Abb. 14 A und B). Untereinheiten der terminalen Oxidase waren glycosyliert. Die SOR war nicht glycosyliert, weil diese nur durch Coomassie und nicht durch Alcianblau gefärbt wurde (Abb. 14 A und B).

### 4.1.12 Deglycosylierung der TQO

Um die Struktur der Kohlenhydratketten, den relativen Gehalt der Glycosylierung an der molekularen Masse und die Funktion zu analysieren, wurde versucht, die TQO (DoxA) enzymatisch oder chemisch zu deglycosylieren. Außerdem wurde versucht, für die Kristallisation für Röntgenstrukturuntersuchungen eine deglycosylierte Form zu gewinnen, weil der freibewegliche Zuckerrest hierbei stören könnte.

#### Enzymatische Deglycosylierung

TQO wurde mit den Enzymen N-Glycosidase F, O-Glycosidase und Neuraminidase und zur Kontrolle ohne Glycosidasen 96 Stunden lang inkubiert. Nach 24, 72 und 96 Stunden wurden Proben entnommen und auf Deglycosylierung untersucht (Abb. 15). Bei einer erfolgreichen Deglycosylierung würde die Untereinheit DoxA eine geringere apparente molekulare Masse als in der glycosylierten Form aufweisen und wäre bei der Alcianblau Färbung nicht detektierbar.



**Abb. 15:** SDS-Gel **A)** mit Alcianblau und **B)** mit Coomassie gefärbt. TQO: native Thiosulfat-Chinon-Oxidoreduktase; M: Protein Marker (# SM0431); K1, K3, K4: Kontrolle ohne Glycosidasen nach einem, drei und vier Tagen Inkubation; D1, D3, D4: Deglycosylierungsansatz nach einem, drei und vier Tagen Inkubation.

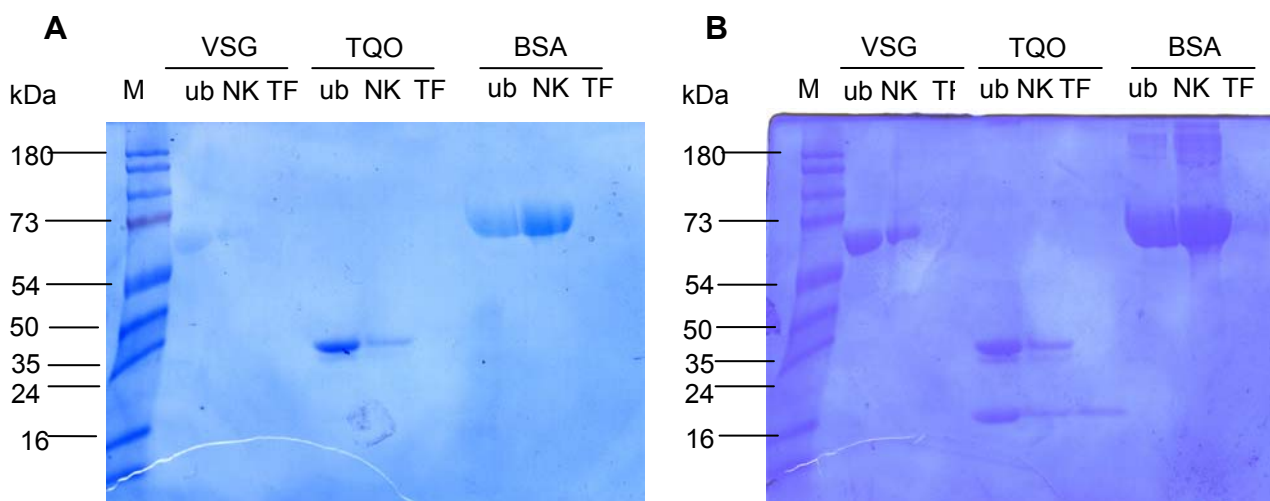
Das mit Glycosidasen behandelte DoxA lief jedoch jeweils auf der gleichen Höhe wie das nicht behandelte und wurde auch durch Alcianblau gefärbt (Abb. 15). Folglich fand keine Deglycosylierung statt.

Ebenso erfolgte jeweils keine Deglycosylierung, unabhängig davon, ob native oder denaturierte TQO und ein zusätzliches Enzym (Endopeptidase H) verwendet wurde (SDS-Gele nicht gezeigt).

#### Chemische Deglycosylierung

Weil die TQO enzymatisch nicht deglycosyliert werden konnte, wurde eine chemische Deglycosylierung mit TFMS (Trifluormethan-Sulfonsäure) versucht. Zur

Kontrolle wurden jeweils Ansätze mit TFMS zusammen mit den glycosylierten Proteinen BSA (Rinderserumalbumin) und VSG (variables Oberflächenprotein von Trypanosomen) und jeweils Ansätze ohne TFMS (Negativkontrollen) angesetzt. Nach der Trennung in einem SDS-Gel und der Färbung mit Alcianblau wurden Proteinbanden bei den unbehandelten Proteinen und den Negativkontrollen von VSG, TQO und BSA jeweils auf gleicher Höhe sichtbar, die bei den Deglycosylierungsansätzen mit TFMS nicht sichtbar waren (Abb. 16 A). Bei der Färbung mit Coomassie wurde bei den Ansätzen mit TFMS bei VSG keine Proteinbande und bei BSA eine schwache Bande bei 66 kDa gefärbt (Abb. 16 B), die bei der Färbung mit Alcianblau nicht zu sehen war. Bei der TQO wurde jeweils eine Proteinbande bei 18 kDa (DoxD) sichtbar (Abb. 16 B). Weil durch TFMS VSG abgebaut wurde und bei BSA eine starke Reduktion der Färbung und keine Größenverschiebung erfolgte, war keine Aussage über eine erfolgreiche Deglycosylierung der TQO möglich.



**Abb. 16:** SDS-Gel **A)** mit Alcianblau und **B)** mit Coomassie gefärbt. VSG: variables Oberflächenprotein von Trypanosomen, TQO: Thiosulfat-Chinon-Oxido-reduktase, BSA: Rinderserumalbumin, M: Protein Marker (# SM0679), ub: unbehandelt, NK: Negativkontrolle, TF: TFMS.

#### 4.1.13 Sequenzanalysen von DoxD und DoxA bzw. *doxD* und *doxA*

Bei einem Vergleich der DoxD und DoxA Sequenzen von *Acidianus ambivalens* mit Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken wurden mehrere Homologe gefunden (Abb. 17). Die kombinierten DoxD und DoxA Aminosäuresequenzen von *Metallospira sedula* (DSM 5348) hatten mit einer Übereinstimmung von 78% zu DoxD/A von *A. ambivalens* eine hochgradige und die von *Sulfolobus solfataricus* und *S. tokodaii* mit jeweils 74% eine hohe Ähnlichkeit. Die kombinierten DoxD/A Sequenzen

des Euryarchaeotas *Picrophilus torridus* wiesen eine Übereinstimmung von 49% mit denen von *A. ambivalens* auf.

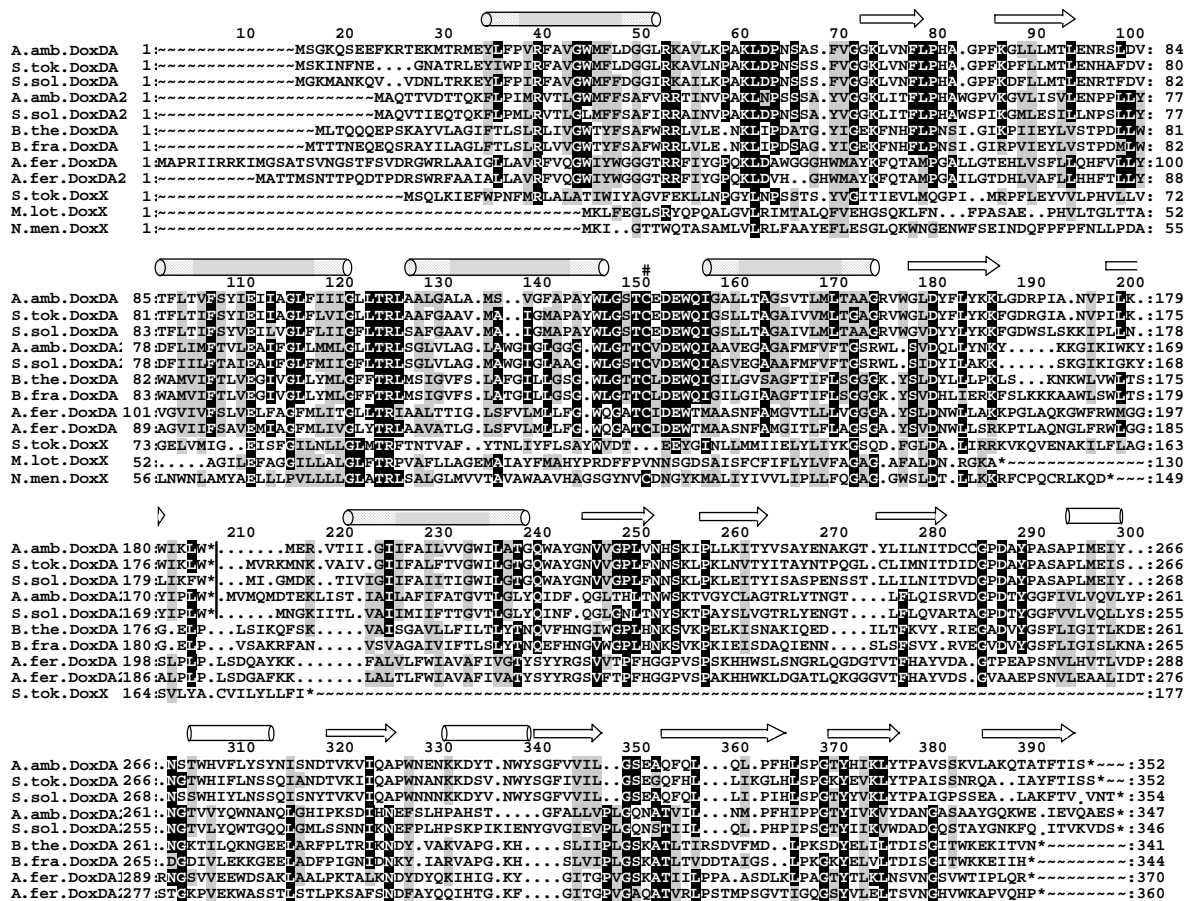
In den Genomsequenzen von *A. ambivalens* und *S. solfataricus* wurde jeweils noch ein zweites homologes *doxDA*-Genpaar mit geringerer Ähnlichkeit in den Aminosäuresequenzen gefunden, die mit DoxD2 und DoxA2 bezeichnet wurden (Abb. 17 und 18). Diese wiesen zueinander eine 70%ige Übereinstimmung und eine 37%ige Übereinstimmung zu DoxD/A von *A. ambivalens* auf. In den phylogenetischen Dendrogrammen der DoxD und DoxA Domänen, die jeweils getrennt voneinander berechnet wurden, lagen deren Verzweigungen jeweils als nächste zu den drei TQOs (Abb. 18; Dendrogramm für DoxA nicht gezeigt).

In den Genomsequenzen von drei *Bacteroides* Stämmen (*B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis* YCH46, *B. fragilis* ATCC 25285/NCTC 9343) wurden *doxDA*-Gene mit 98%iger Übereinstimmung in den Sequenzen der beiden *B. fragilis* Stämme und jeweils 74%iger Übereinstimmung dieser Sequenzen mit der von *B. thetaiotaomicron* gefunden, die jeweils zu einem einzelnen *doxDA*-ORF fusioniert waren (Abb. 17). Die Übereinstimmung von DoxD/A von *A. ambivalens* betrug 34% mit der Sequenz von *B. thetaiotaomicron* und jeweils 29% mit denen der beiden *B. fragilis* Stämme. Außerdem wurden zwei andere fusionierte *doxDA*-Gene in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander in der Genomsequenz des Bakteriums *Acidithiobacillus ferrooxidans* mit 70%iger Identität zueinander gefunden (Abb. 17 und 18). Ein vielfacher Sequenzvergleich zeigte viele konservierte Reste, aber nur ein einzelnes konserviertes Cystein, welches eine mögliche TS-Bindestelle darstellen könnte (Abb. 17).

Darüber hinaus war DoxD Teil einer sehr großen Sequenzfamilie in der PFAM Datenbank, welche mindestens 147 Sequenzen enthält (Stand: November 2007; PF04173). Alle diese „DoxD“ Proteine oder Domänen in der Datenbank hatten eine ähnliche Größe und vier vorhergesagte Transmembranhelices (Abb. 17). Allerdings fehlte in den meisten der konservierte Cysteinrest. Ein vielfacher Sequenzvergleich zeigte, dass viele von diesen außer in den transmembranen Regionen nur einige wenige konservierte Reste mit den oben beschriebenen eigentlichen DoxD Untereinheiten teilten (Abb. 17). Der gemeinsame phylogenetische Ursprung dieser daraufhin genannten „DoxX“ Proteine mit DoxD lag weit entfernt, was aus dem *Alignment* und dem Dendrogramm ersichtlich wird (Abb. 17; Abb. 18). Daher wurden diese DoxX Proteine schließlich in eine zweite paraloge Proteinfamilie mit



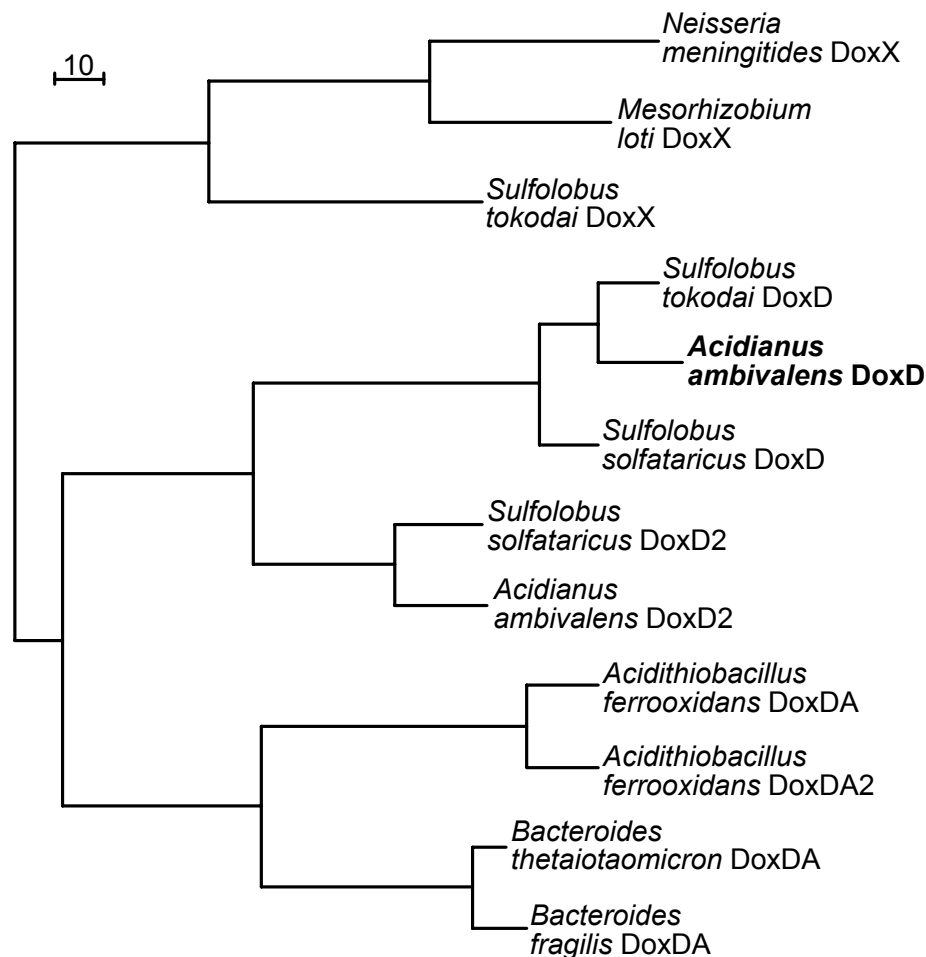
unbekannter Funktion eingeordnet (PF07681), welche dem Clan der DoxD-ähnlichen Proteine (CL0131) angehört. Alle Mitglieder dieses Clans sind Membranproteine. Ein Gen mit Ähnlichkeit zu *doxA* fehlte in der Nachbarschaft der *doxX*-Gene. DoxD aus *A. ambivalens* ist bislang das einzige Protein dieses Clans, das ausführlich biochemisch charakterisiert ist.



**Abb. 17:** Aminosäuresequenzvergleich der kombinierten DoxD und DoxA Aminosäuresequenzen von *A. ambivalens* mit ausgewählten Homologen. Konservierte Reste wurden schwarz und konservierte Austausche grau hinterlegt. Vorhergesagte helicale Bereiche wurden durch weiße Zylinder im löslichen Teil, im zentralen Bereich als graue und an den Helixenden gestreifte Zylinder für transmembrane Helices und  $\beta$ -Faltblattregionen durch Pfeile über den Sequenzen dargestellt. \*: Stop Codons der Gene; |: Ende der DoxA Sequenz; #: konserviertes Cystein. Accession numbers (Genbank/Swissprot): ***Acidianus ambivalens* DoxD und DoxA, CAA70827 und CAA70828; *S. tokodaii* DoxD und DoxA, NP\_377837 und NP\_377838; *Sulfolobus solfataricus* DoxD und DoxA, NP\_343149 und NP\_343148; *A. ambivalens* DoxD2 und DoxA2, CAC86936 und CAC86935; *Acidithiobacillus ferrooxidans* fusioniert DoxD und DoxA, NP\_377837 und NP\_377838; *Bacteroides thetaiotaomicron* fusioniert DoxD, NP\_809428; *B. fragilis* fusioniert DoxD translated von der Genomsequenz, NC\_003228; *Neisseria meningitidis* DoxX, CAB83537; *Mesorhizobium loti* DoxX, NP\_103189; *S. solfataricus* DoxD2 und DoxA2, NP\_343280 und NP\_343281; *S. tokodaii* DoxX, NP\_376777.**

Eine hypothetische Chinon-Bindestelle (Fisher und Rich, 2000) wurde in DoxD und DoxA durch Aminosäuresequenzvergleiche nicht gefunden. Von den vier möglichen

N-Glycosylierungsstellen an den Asparaginresten 252, 269, 303 und 351 in DoxA, die jeweils in einer der definierten Akzeptor Sequenzen NXT oder NXS enthalten waren, waren die Asp-Reste 252 und 303 konserviert (Abb. 17). DoxA enthält eine vorhergesagte N-terminale Transmembranhelix (Abb. 17). Nach der Topologievorhersage liegt der Hauptteil des DoxA Proteins außen und der N-Terminus innen.

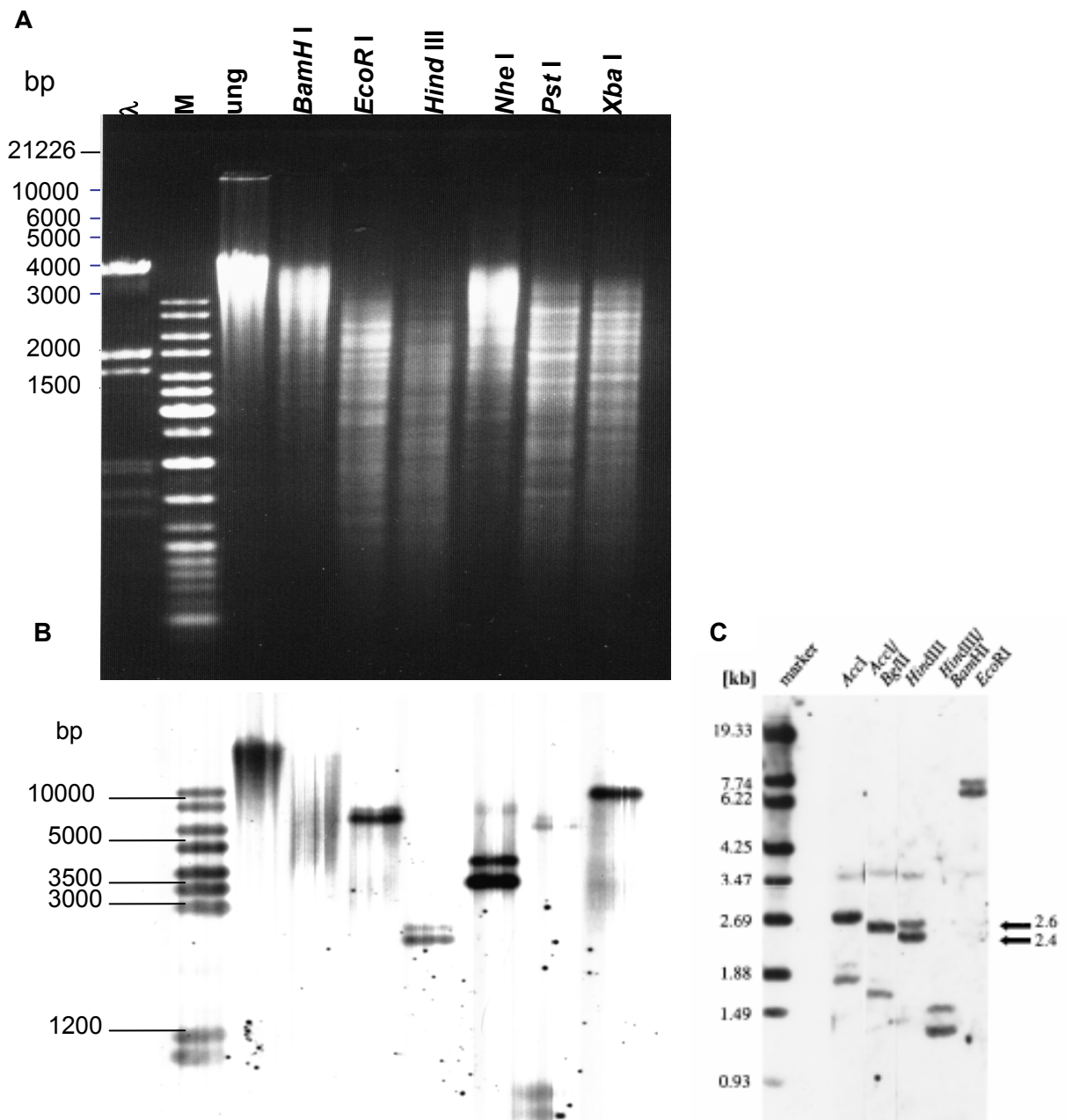


**Abb. 18:** Phylogenetischer Stammbaum der DoxD Untereinheit oder Domäne der Aminosäuresequenz, die aus dem Aminosäuresequenzvergleich (Abb. 17) berechnet wurde, unter Verwendung der Methode des maximum likelihood zur Berechnung von Stammbäumen. Vor der Berechnung wurde der Aminosäuresequenzvergleich bis auf die konservierten Reste der DoxD Untereinheit oder Domäne gekürzt. Die Bezeichnungen der Untereinheiten und *Accession numbers* sind in der Legende von Abb. 17 zu finden.

#### 4.1.14 Kopienzahl des *doxDA*-Operons im Genom von *Acidianus ambivalens*

Purschke *et al.* hatten 1997 festgestellt, dass 2 Kopien des *doxDA*-Operons (TQO) im Genom von *A. ambivalens* vorhanden sind. Um die Aussage zu überprüfen und um festzustellen, ob mehrere *doxDA* Transkripte zu erwarten waren, wurde eine Southern-Analyse durchgeführt. Hierfür wurde Gesamt-DNA mit mehreren

Restriktionsenzymen hydrolisiert, elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und mit einer *doxDA*-DNA-Sonde hybridisiert (Abb. 19).



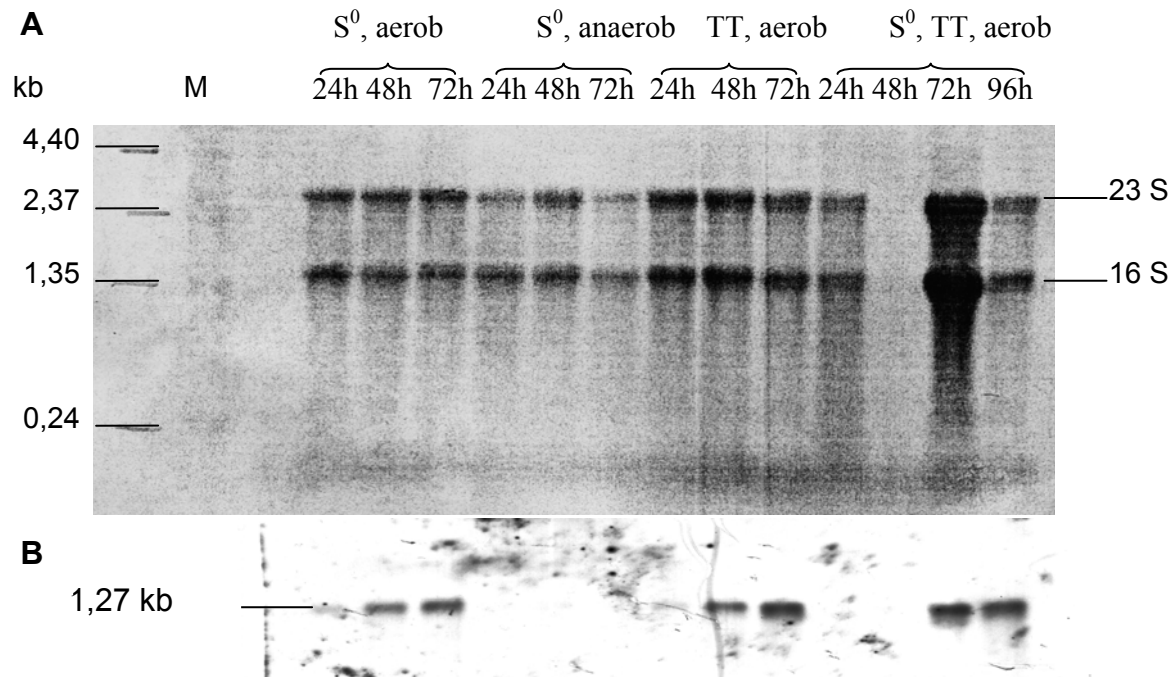
**Abb. 19:** **A)** Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel mit genomischer DNA von *Acidianus ambivalens*. Ungeschnitten (ung) und hydrolisiert mit verschiedenen Restriktionsenzymen. bp: Basenpaare,  $\lambda$ : Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker, 3; M: DNA Marker (#SM0331). Es wurden 1,5  $\mu$ g *Acidianus* DNA pro Spur aufgetragen. **B)** Southern-Analyse mit einer *doxDA*-DNA-Sonde. **C)** Southern-Analyse mit einer *doxDA*-DNA-Sonde aus Purschke *et al.*, 1997.

Bei der mit *Hind* III hydrolisierten DNA, welches nicht in *doxDA* schneidet, wurden ein stärker hybridisiertes Fragment bei ca. 2,4 kb und ein schwächer hybridisiertes Fragment bei ca. 2,6 kb erhalten (Abb. 19 B), was dem Ergebnis von Purschke

entspricht (Abb. 19 C). Bei *EcoR* I und *Xba* I, die jeweils ebenso nicht in *doxDA* schneiden, wurde jeweils eine Bande bei ca. 7 bzw. 10 kb sichtbar (Abb. 19 B). Im Gegensatz dazu wurden in der Veröffentlichung von Purschke bei der mit *EcoR* I hydrolysierten DNA 2 Fragmente im Bereich von 6,2 und 7,7 kb nachgewiesen (Abb. 19 C). Bei *Nhe* I, welches einmal in *doxDA* schneidet, wurden 2 Banden bei ca. 3,8 und 4,5 kb und bei *Pst* I, welches zweimal in *doxDA* schneidet, 3 Banden bei ca. 0,6 kb, 0,7 kb und 7 kb sichtbar (Abb. 19 B). Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten im Gegensatz zur Veröffentlichung von Purschke *et al.* (1997) darauf hin, dass das *doxDA*-Operon nur einmal im Genom von *A. ambivalens* vorliegt.

#### 4.1.15 Nachweis der *doxDA*-mRNA durch Northern-Analyse

Um festzustellen, ob mRNA der *doxDA*-Gene (TQO) zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums von *Acidianus* bei unterschiedlichen Bedingungen vorliegt, wurde eine Northern-Analyse durchgeführt. Hierfür wurde *Acidianus* anaerob mit Schwefel ( $S^0$ ), aerob mit  $S^0$ , aerob mit Tetrathionat (TT) oder aerob mit  $S^0$  und TT kultiviert, und Gesamt-RNA nach 24, 48 und 72 Stunden Kultivierung isoliert, bei der Kultivierung mit  $S^0$  und TT zusätzlich auch nach 96 Stunden. Die in einem Agarosegel aufgetrennte und auf eine Nylon-Membran übertragene RNA wurde zunächst zur quantitativen und qualitativen Kontrolle mit Methylblau angefärbt (Abb. 20 A). Der Nachweis der *doxDA*-mRNA erfolgte mit einer *doxDA*-DNA-Sonde. Anaerob bei Wachstum mit Schwefel lag zu keinem Zeitpunkt *doxDA*-mRNA vor (Abb. 20 B). Übereinstimmend damit wurde in Extrakten (cytoplasmatische und Membranfraktion) von anaerob mit  $S^0$  kultivierten Zellen keine TQO-Aktivität gemessen. Aerob wurde *doxDA*-mRNA bei Wachstum mit allen drei Substraten detektiert ( $S^0$ , TT oder S/TT; Abb. 20 B). Die Größe lag bei ca. 1,27 kb, was in etwa mit dem Ergebnis aus der Veröffentlichung von Purschke *et al.* (1997) übereinstimmte. Nach 24 Stunden Wachstum lag jeweils weniger *doxDA*-mRNA vor als nach 48 und 72 Stunden bzw. 72 und 96 Stunden (Abb. 20). Bei aerobem Wachstum mit TT lag nach 72 Stunden mehr *doxDA*-mRNA vor als nach 48 Stunden.



**Abb. 20:** Northern-Analyse mit *Acidianus*-RNA und einer *doxDA*-DNA-Sonde. Aufgetragen wurden jeweils 5 µg RNA pro Spur. S<sup>0</sup>: Schwefel, TT: Tetrathionat, h: Stunden, M: RNA-Größenstandard **A**) Methylenblau gefärbte Membran mit 16 S und 23 S rRNA. **B**) Röntgenfilm mit detektierter *doxDA*-RNA.

## 4.2 Tetrathionat-Hydrolase (TTH)

### 4.2.1 Säulenchromatographische Reinigungsversuche einer TTH

Im löslichen Überstand (cytoplasmatische Fraktion) von aerob, mit TT kultivierten *Acidianus ambivalens* Zellen, wurde eine spezifische TT-Hydrolase (TTH)-Aktivität von 44 mU (mg Protein)<sup>-1</sup> und in der Membranfraktion von 0,4 mU (mg Protein)<sup>-1</sup> bestimmt (Tab. 6, Seite 64), während im Membransolubilisat keine TTH-Aktivität gemessen wurde. Eine Reihe unterschiedlicher säulenchromatographische Reinigungsversuche der TTH wurde durchgeführt, von denen zwei hier exemplarisch dargestellt sind.

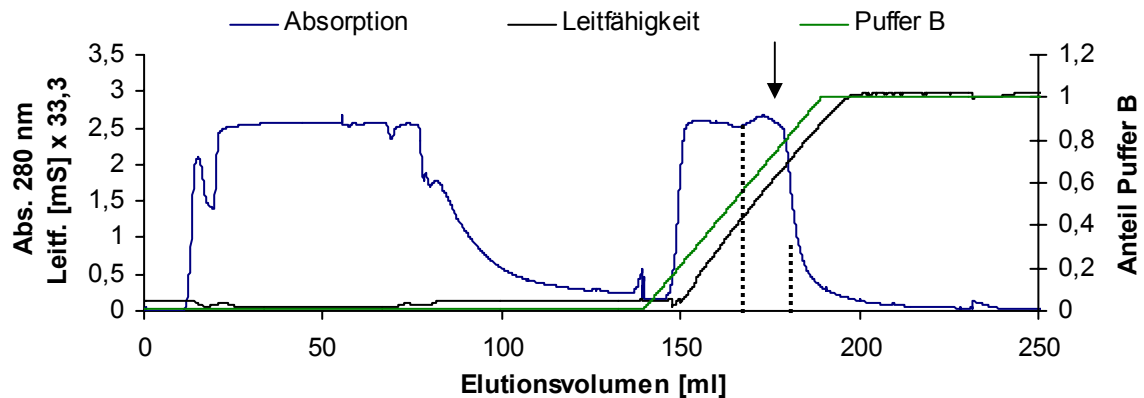
#### 4.2.1.1 Erster Reinigungsversuch

##### 1. und 2. Schritt, DEAE-Anionenaustauschchromatographie

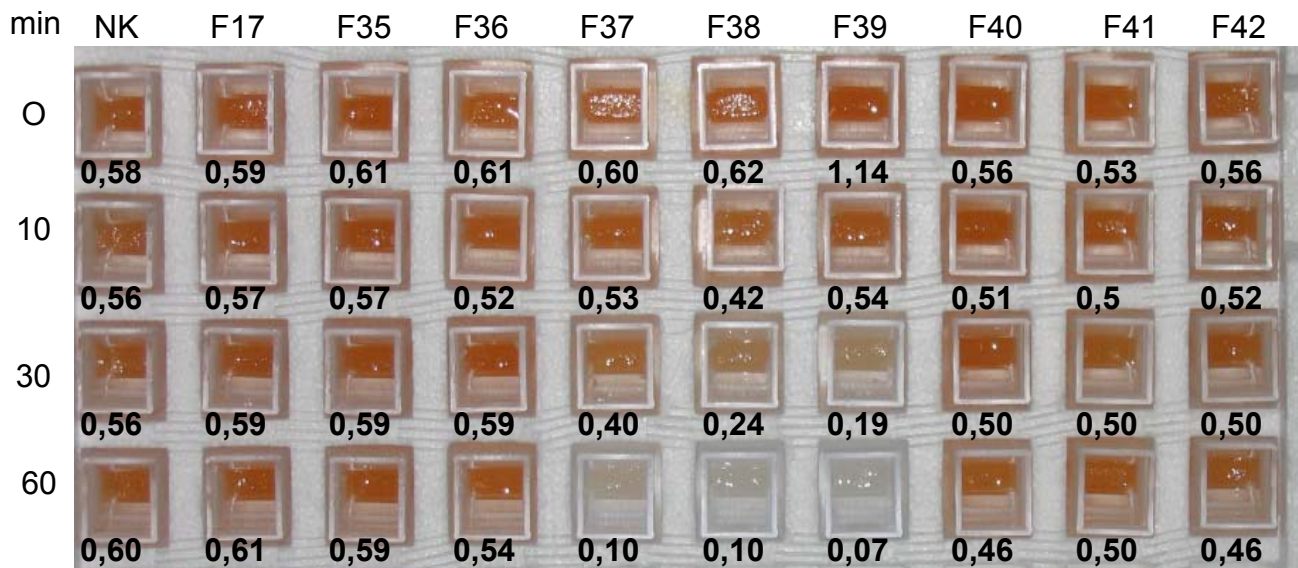
Die Trennung der cytoplasmatischen Proteine erfolgte zuerst durch DEAE Anionenaustauschchromatographie. TTH-Aktivität wurde in den Fraktionen 37 bis 39 gemessen (Elutionsvolumen: 170 bis 185 ml; Abb. 21; Abb. 22). Die Elution der TTH erfolgte ab einer NaCl Konzentration von 500 mM (Abb. 21). Die spezifische Aktivität der drei vereinten Fraktionen, genannt „TTH DE1“, betrug 0,47 U (mg Protein)<sup>-1</sup> und

die Gesamtaktivität 19 Units (Tab. 6, Seite 64). Um die Auftrennung zu verfeinern, wurde der Reinigungsschritt mit einem flacheren Gradienten wiederholt.

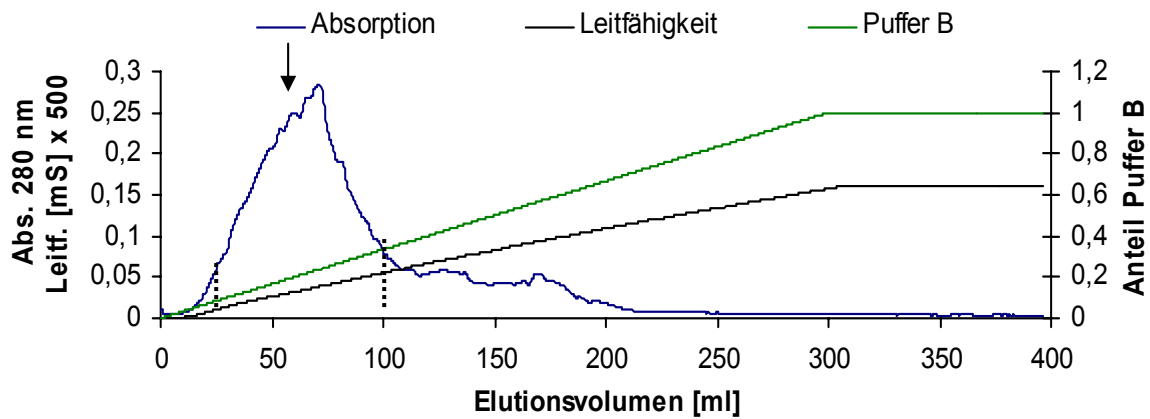
Hierbei wurde TTH ab einer NaCl Konzentration von 70 mM in den Fraktionen 9 bis 14 eluiert, die zur Fraktion „TTH DE2“ vereint wurden (Elutionsvolumen: 25 bis 100 ml; Abb. 23). Die spezifische Aktivität betrug 0,67 U/mg (11 Units insgesamt; Tab. 6, Seite 64).



**Abb. 21:** Elutionsdiagramm der ersten DEAE-Anionenaustauschchromatographie zur Trennung der cytoplasmatischen Proteine. Gestrichelte Linien, Pfeil: Elutionsbereich, in dem TTH eluiert wurde.



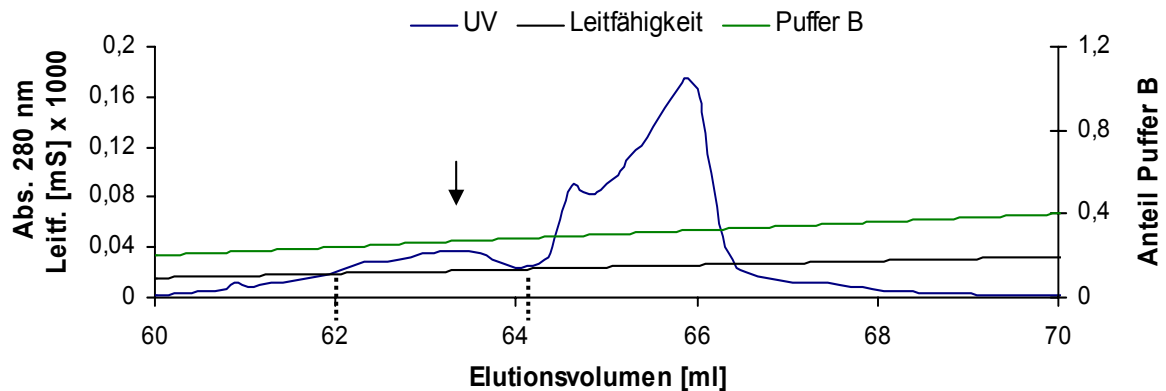
**Abb. 22:** TT Konzentrationsbestimmung durch Cyanolyse beim TTH-Aktivitätstest mit den Fraktionen der ersten DEAE-Chromatographie zu den Zeitpunkten 0, 10, 30 und 60 min. F 17: Fraktion 17, F 35 - 42: Fraktionen 35 bis 42; NK: Negativ Kontrolle mit Puffer; Zahlen unter den Küvetten: Absorptionswerte bei 460 nm. (siehe auch Kap. 4.2.5.1)



**Abb. 23:** Elutionsdiagramm der zweiten DEAE-Anionenaustauschchromatographie der Fraktion „TTH DE1“. Gestrichelte Linien, Pfeil: Elutionsbereich, in dem TTH eluiert wurde.

### 3. Schritt, MonoQ-Anionenaustauschchromatographie

Im dritten Reinigungsschritt wurden die Proteine der Fraktion „TTH DE2“ durch eine MonoQ-Säule getrennt. Die Elution der TTH erfolgte ab 190 mM NaCl in den Fraktionen 5 und 6 (Elutionsvolumen: 62 bis 64 ml, Abb. 24). Die spezifische TTH-Aktivität der vereinten Fraktion „TTH MQ“ betrug 2,9 U/mg (Tab. 6).



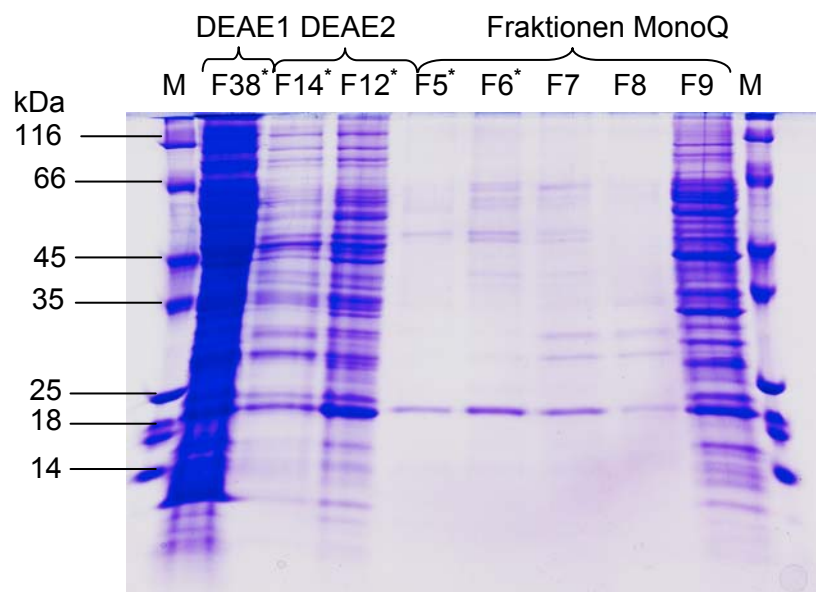
**Abb. 24:** Elutionsdiagramm der MonoQ-Anionenaustauschchromatographie der Fraktion „TTH DE2“. Gestrichelte Linien, Pfeil: Elutionsbereich, in dem TTH eluiert wurde.

Die spezifische TTH-Aktivität erhöhte sich nach jedem Reinigungsschritt (Tab. 6). Die Reinigungsfaktoren lagen bei 10,7 (1. DEAE), 15,2 (2. DEAE) und 65,9 (3. MonoQ). Von 498 mg Gesamtprotein in der cytoplasmatischen Fraktion blieben 1,2 mg Protein am Ende erhalten. Die Ausbeute betrug nach dem ersten chromatographischen Schritt 86%, nach dem zweiten Schritt 50% und nach dem dritten Schritt 16% der Gesamtaktivität des löslichen Überstands.

**Tab. 6:** Reinigungstabelle des ersten Versuchs der TTH-Reinigung

Reinigungsfraktion	Gesamtaktivität [U]	Gesamtaktivität in %	Gesamtprotein [mg]	Spezifische TTH-Aktivität [U/mg]	Reinigungsfaktor
Löslicher Überstand (Cytoplasma)	22	100	498	0,044	1
Membranfraktion	0,04	---	109	0,0004	---
Membransolubilisat	0	---	78	0	---
<b>1. DEAE</b>					
TTH DE1	19	86	41	0,47	10,7
<b>2. DEAE</b>					
TTH DE2	11	50	16,5	0,67	15,2
<b>3. MonoQ</b>					
TTH MQ	3,5	16	1,2	2,90	65,9

Nach der Trennung der cytoplasmatischen Proteine durch zweimalige DEAE-Chromatographie waren in den TTH-aktiven Fraktionen immer noch viele verschiedene Proteine vorhanden (Abb. 25). Bei der nachfolgenden MonoQ-Chromatographie wurde ein großer Teil der Proteine von den Fraktionen mit TTH-Aktivität getrennt (F 9, Elutionsvolumen 65 bis 66 ml; Abb. 24, 25). In den aktiven Fraktionen wurde ein Protein mit einer apparenten molekularen Masse von 18 kDa angereichert, das anschließend zur Identifizierung N-terminal sequenziert wurde (Abb. 25). Die erhaltene Sequenz war **(M)KVTPG**. Ein Sequenzvergleich ergab, dass sie mit einer Pyrophosphatase übereinstimmte.



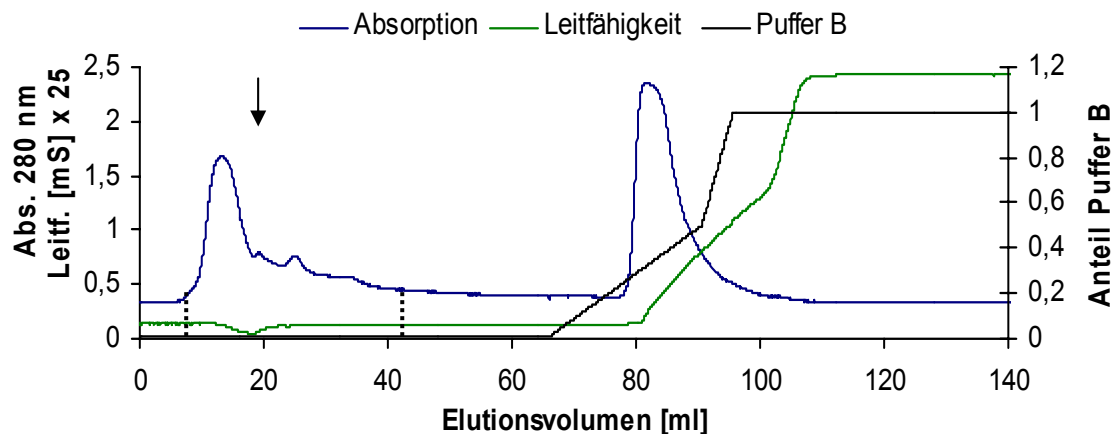
**Abb. 25:** Coomassie gefärbtes SDS-Gel mit Fraktionen verschiedener - Schritte der ersten TTH-Reinigung. \*: Fraktionen mit TTH-Aktivität, M: Protein Marker (# SM0431).



### 4.2.1.2 Zweiter Reinigungsversuch

#### 1. Schritt: Hydroxyapatit (HTP)-Chromatographie

Um den Erfolg der Reinigung zu verbessern und Verluste zu minimieren, erfolgte die Trennung der cytoplasmatischen Proteine (200 mg) in der zweiten Reinigung der TTH zuerst durch Hydroxyapatit (HTP)-Chromatographie. Die TTH-Aktivität wurde in Fraktionen des Auftragsgipfels gemessen (Elutionsvolumen: 8 bis 44 ml, Abb. 26).

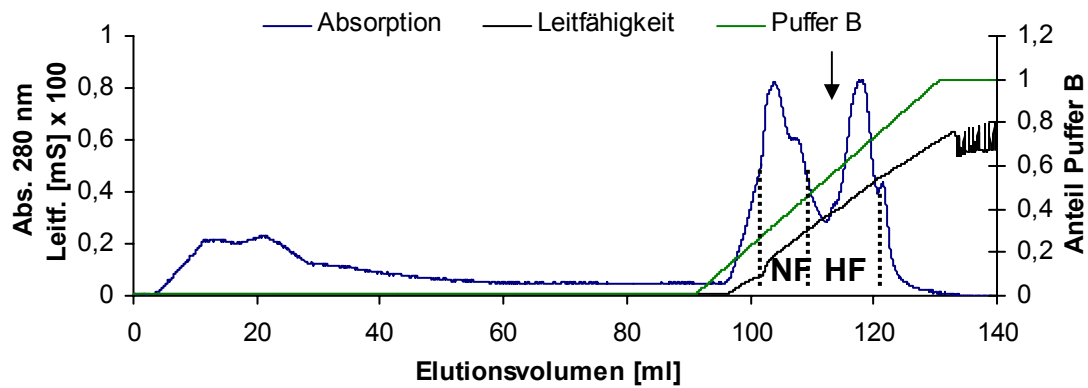


**Abb. 26:** Elutionsdiagramm der Hydroxyapatit-Chromatographie der cytoplasmatischen Proteine. Gestrichelte Linien, Pfeil: Elutionsbereich, in dem TTH eluiert wurde.

Die spezifische Aktivität der vereinten Fraktion „TTH HTP“ betrug 0,27 U/mg Protein (Tab. 9, Seite 68).

#### 2. Schritt: Q-Sepharose

Im zweiten Schritt wurden 25 mg Protein der Fraktion „TTH HTP“ durch Q-Sepharose getrennt (Abb. 27). In der Fraktion des Auftragsgipfels (Elutionsvolumen 5 bis 40 ml), genannt „F2 Q-Seph.“, und in der Fraktion 14 (Elutionsvolumen 101 bis 103 ml) wurde jeweils keine TTH-Aktivität nachgewiesen. TTH wurde ab einer NaCl-Konzentration von 330 mM eluiert. Die spezifischen TTH-Aktivitäten der Fraktionen 15 bis 23 (Elutionsvolumen 103 bis 121 ml) lagen im Bereich von 0,1 bis 0,9 U/mg (Tab. 7). Die spezifische TTH-Aktivität der zur Reinigung weiter verwendeten, aus den Fraktionen 18 bis 23 vereinten Hauptfraktion „TTH Q-Seph. HF“ betrug 0,44 U/mg Protein (Tab. 9, Seite 68). Die spezifische Aktivität der Nebenfraktion „TTH Q-Seph. NF“ (Fraktionen 15 bis 17) betrug 0,11 U/mg (Tab. 9). In den aktiven Fraktionen waren zudem weitere Proteinbanden zu erkennen (Abb. 28).

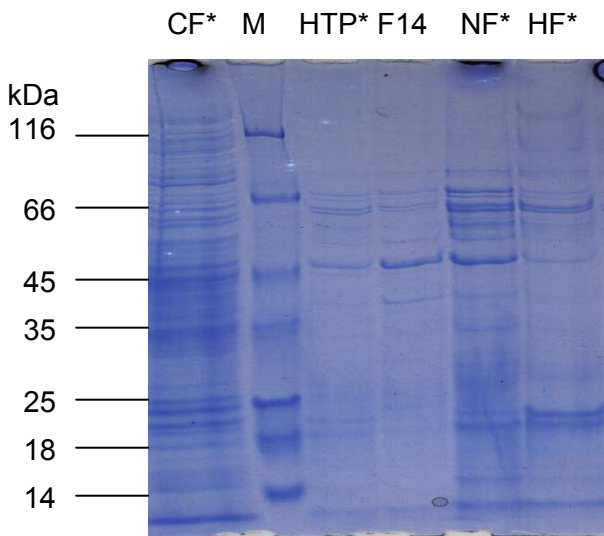


**Abb. 27:** Elutionsdiagramm der Q-Sepharose-Anionenaustauschchromatographie der Fraktion „TTH HTP“. Gestrichelte Linien, Pfeil: Elutionsbereich, in dem TTH eluiert wurde; NF: Nebenfraktion; HF: Hauptfraktion.

**Tab. 7:** Spezifische TTH-Aktivitäten der Q-Sepharose Fraktionen

Fraktion	15	16	17	18	19	20	21	22	23	NF <sup>4</sup>	HF <sup>5</sup>
EV <sup>1</sup> [ml]	103-105	105-107	107-109	109-111	111-113	113-115	115-117	117-119	119-121	103-109	109-121
Spez. Akt. [U/mg] <sup>2</sup>	0,11	0,13	0,10	0,28	0,50	0,90	0,75	0,50	0,14	0,11	0,44
GP <sup>3</sup> [mg]	3,0	2,6	3,5	1,3	0,7	0,4	0,3	0,2	0,3	9,1	3,2
GA <sup>4</sup> [U]	0,33	0,34	0,35	0,36	0,35	0,36	0,23	0,1	0,04	1,0	1,4

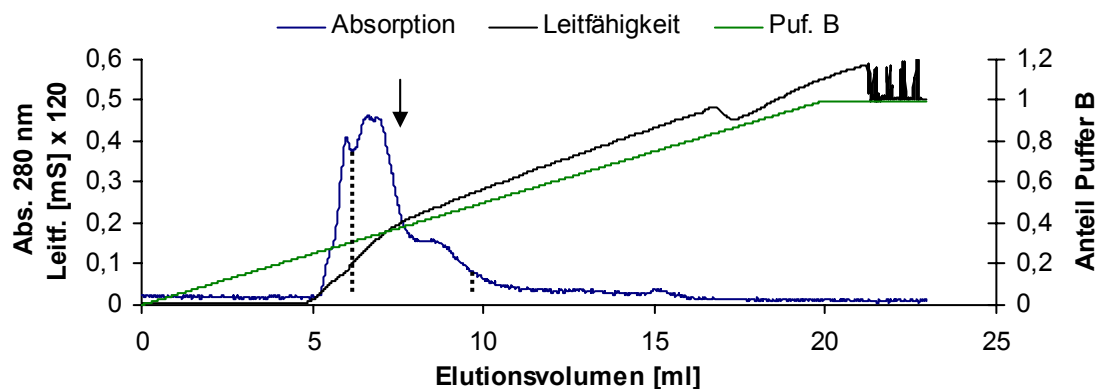
<sup>1</sup>EV: Elutionsvolumen; <sup>2</sup>Spez. Akt.: spezifische Aktivität; <sup>3</sup>GP: Gesamtprotein; <sup>4</sup>GA: Gesamtaktivität; <sup>4</sup>NF: Nebenfraktion; <sup>5</sup>HF: Hauptfraktion



**Abb. 28:** Coomassie gefärbtes SDS-Gel mit Fraktionen nach Q-Sepharose-Chromatographie der Fraktion „TTH HTP“. \*: Fraktionen mit TTH-Aktivität, CF: cytoplasmatische Fraktion, M: Protein Marker (# SM0431), HTP: „TTH HTP“, F14: Fraktion 14, NF: „TTH Q-Sep. NF“, HF: „TTH Q-Sep. HF“.

### 3. Schritt: MonoQ und Surperdex S-200

Im dritten Schritt wurden 0,7 mg Protein der Fraktion „TTH Q-Sep. HF“ durch eine MonoQ-Anionenaustauschchromatographie getrennt. Die Elution der TTH erfolgte ab 150 mM NaCl (Abb. 29). TTH-Aktivität wurde in den Fraktionen 7 bis 10 gemessen (Elutionsvolumen: 6 bis 10 ml). Die spezifische Aktivität der vereinten Fraktion „TTH MQ2“ betrug 0,57 U/mg (Tab. 9, Seite 68).



**Abb. 29:** Elutionsprofil der MonoQ-Anionenaustauschchromatographie der Fraktion „TTH Q-Seph. HF“. Gestrichelte Linien, Pfeil: Elutionsbereich, in dem TTH eluiert wurde.

Alternativ wurde versucht, die TTH durch Gelfiltrationschromatographie (Superdex S-200) zu reinigen. Hierfür wurden 2 mg Protein der Fraktion „TTH Q-Seph. HF“ aufgetragen, wobei jedoch aufgrund der geringen Proteinmenge kein Elutionsprofil erhalten wurde. Trotzdem wurden Fraktionen mit einer messbaren Absorption bei 280 nm konzentriert (Tab. 8). Die spezifischen TTH-Aktivitäten in den Fraktionen 6, 10, 11, 13 und 22 lagen im Bereich von 0,6 bis 3,9 U/mg Protein (Tab. 8).

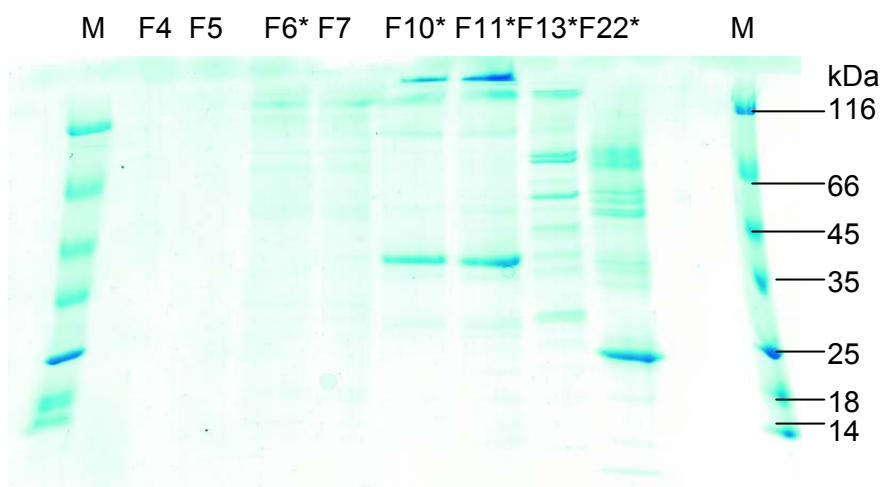
**Tab. 8:** Spezifische TTH-Aktivitäten der Superdex S-200 Fraktionen

Fraktion	4	5	6	7	10	11	13	22
<sup>1</sup> EV [ml]	95- 100	100- 105	105- 110	110- 115	125- 130	130- 135	140- 145	185- 190
Abs. 280 nm	0,007	0,008	0,009	0,002	0,006	0,006	0,001	0,002
Spez. Akt. <sup>2</sup> [U/mg]	0	0	0,6	0	3,9	3,5	1,6	3,9
GP <sup>3</sup> [µg]	46	36	46	51	36	39	58	44
GA <sup>4</sup> [mU]	0	0	28	0	140	137	93	172

<sup>1</sup>EV: Elutionsvolumen; <sup>2</sup>Spez. Akt.: spezifische Aktivität; <sup>3</sup>GP: Gesamtprotein; <sup>4</sup>GA: Gesamtaktivität

Im SDS-Gel waren die Proteinbandenmuster der Fraktionen 10 und 11 ähnlich, jeweils mit stark gefärbten Banden bei ca. 41 kDa und 126 kDa (Abb. 30), die ohne Ergebnis N-terminal sequenziert wurden. Die spezifischen TTH-Aktivitäten betragen 3,9 und 3,5 U/mg (Tab. 8). Die Proteinbandenmuster der Fraktionen 6 und 7 waren ebenfalls einander ähnlich, jeweils mit einer stärker gefärbten Bande bei ca. 120 kDa (Abb. 30). Die spezifischen TTH-Aktivitäten betragen 0,6 und 0 U/mg (Tab. 8). Im Proteinbandenmuster der Fraktion 13 waren Banden zwischen 30 und 130 kDa zu erkennen, die mit ähnlicher Intensität gefärbt waren (Abb. 30). Die spezifische TTH-Aktivität betrug 1,6 U/mg (Tab. 8). Im Proteinbandenmuster der Fraktion 22 war eine

Bande bei ca. 23 kDa stärker gefärbt als die anderen (Abb. 30). Die spezifische TTH-Aktivität betrug 3,9 U/mg (Tab. 8).



**Abb. 30:** Coomassie gefärbtes SDS-Gel mit Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie (S-200). \*: Fraktionen mit TTH-Aktivität; M: Protein Marker (# SM0431); F 4 (5, 6, 7, 10, 11, 13, 22): Fraktion 4 (5, 6, 7, 10, 11, 13, 22).

Die spezifische TTH-Aktivität erhöhte sich nach jedem Reinigungsschritt (Tab. 9). Die maximalen Reinigungsfaktoren der Schritte bezüglich der gesamten Reinigung lagen bei 6 (1. HTP), 10 (2. Q-Seph.) und 89 (3. S-200). Die berechnete Ausbeute war 17 %.

**Tab. 9:** Reinigungstabelle des zweiten Versuches der TTH-Reinigung

Reinigungsfraction	Gesamtaktivität [U]	Gesamtaktivität in Prozent	Gesamtprotein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungsfaktor
Löslicher Überstand (Cytoplasma)	8,8	100	200	0,044	1
<b>1. Schritt: Hydroxyapatit</b>					
TTH HTP	7	80	26	0,27	6
<b>2. Schritt: Q-Sephrose</b>					
TTH Q-Seph. HF	1,4	16	3,2	0,44	10
TTH Q-Seph. NF	1,0	11	9,1	0,11	2,5
Summe	2,4	27	12,3	---	---
<b>3. Schritt: MonoQ</b>					
TTH MQ2	0,3	3	0,5	0,57	13
<b>3. Schritt alternativ: Gelfiltration (Superdex S-200)</b>					
TTH aktive Fraktionen	0,6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	0,22 <sup>a</sup>	0,6 bis 3,9	14 bis 89
Berechnete Werte <sup>b</sup>	1,5	17	3,1	0,48	11

a: Summe der jeweiligen Werte der TTH aktiven Fraktionen. b: Die berechneten Werte ergeben sich aus der Summe der Werte des 3. Schritts (MonoQ + Superdex S-200) und der theoretischen Ergebnisse eines 3. Schritts für die Fraktion „TTH Q-Seph. NF“.

### 4.2.2 Messung der Pyrophosphatase-Aktivität

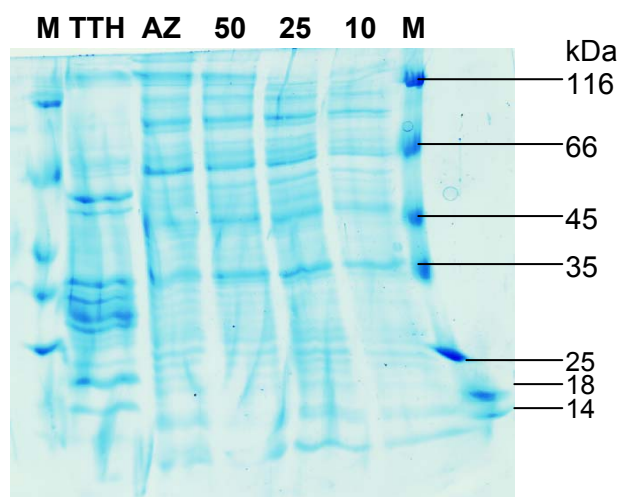
Um zu untersuchen, ob bei der ersten Reinigung der TTH eine Pyrophosphatase (PPase) angereichert worden war (Kap. 4.2.1.1), wurden die Fraktionen „TTH MQ“, „TTH Q-Seph. NF“, „TTH Q-Seph. HF“ und „F2 Q-Seph.“ auf PPase-Aktivität getestet. In der Fraktion „F2 Q-Seph.“ wurde keine PPase-Aktivität gemessen. Die spezifische PPase-Aktivität der Fraktion „TTH MQ“ betrug 107 U/mg, der Fraktion „TTH Q-Seph. NF“ 33 U/mg und der Fraktion „TTH Q-Seph. HF“ 51 U/mg. Daraus folgte, dass die gemessene PPase-Aktivität auf die entsprechende, N-terminal sequenzierte Proteinbande zurückgeführt werden kann.

### 4.2.3 Solubilisierung der TTH durch Spheroplastierung

Da die TTH in das Pseudoperiplasma sekretiert werden könnte, wurde versucht, *Acidians ambivalens* Zellen zu spheroplastieren und die pseudoperiplasmatischen Proteine von den Spheroplasten durch Zentrifugation oder Filtration als zellfreie Extrakte zu trennen. 0,5 g Zellen wurden jeweils in Spheroplastierlösung (Saccharosepuffer) mit 10, 25 oder 50 mM EDTA inkubiert. Als Kontrolle wurden 0,5 g Zellen in Spheroplastierlösung mit 50 mM EDTA durch Ultraschall aufgeschlossen.

Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Zellen nach der Spheroplastierung intakt waren und die Anzahl dem Ausgangswert entsprochen hat. Die Proteinbandenmuster der zellfreien Extrakte nach der Spheroplastierung glichen jeweils dem des kompletten Zellaufschlusses (Abb. 31).

Um die Auswirkungen auf die TTH-Aktivität zu untersuchen, wurden durch Dialyse niedermolekulare Substanzen und Saccharose aus den zellfreien Extrakten entfernt. Die spezifische TTH-Aktivität erhöhte sich jeweils nach der Dialyse (Tab. 10). Die Solubilisierung der TTH war bei einer geringeren EDTA Konzentration erfolgreicher, weil die spezifische TTH-Aktivität beim Spheroplastierungsansatz mit 10 mM EDTA am höchsten war. Sie betrug 0,68 vor und 1,09 U (mg Protein)<sup>-1</sup> nach der Dialyse. Die geringste spezifische TTH-Aktivität wurde bei den aufgeschlossenen Zellen gemessen. Sie betrug 0,01 vor und 0,04 U (mg Protein)<sup>-1</sup> nach der Dialyse. Mit 0,55 U (mg Protein)<sup>-1</sup> war die spezifische TTH-Aktivität des Spheroplastierungsansatzes bei 25 mM EDTA zweimal so hoch wie beim Ansatz mit 50 mM EDTA (0,27 U/mg) jeweils nach der Dialyse (Tab. 10).



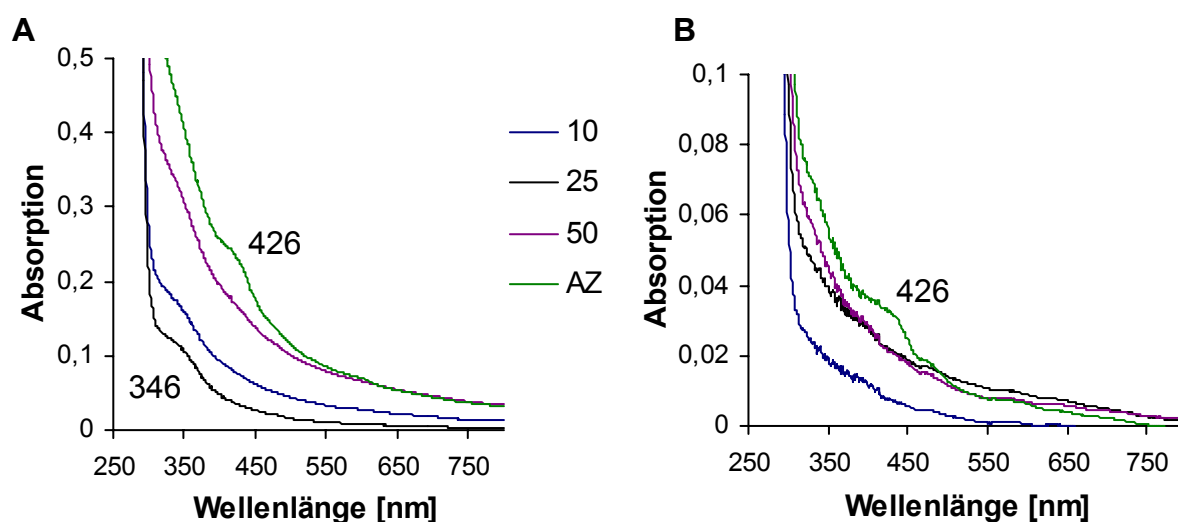
**Abb. 31:** Coomassie gefärbtes SDS-Gel mit zellfreien Extrakten der Spheroplastierung mit 10 mM (10), 25 mM (25) oder 50 mM (50) EDTA. AZ: aufgeschlossene Zellen, TTH: Fraktion „TTH Q-Seph. HF“, M: Protein Marker (# SM0431).

**Tab. 10:** Spezifische TTH-Aktivitäten vor und nach Dialyse

Zellfreier Extrakt EDTA [mM]	Gesamtprotein [mg]	vor Dialyse		nach Dialyse	
		GA <sup>2</sup> [U]	Spez. Akt. <sup>3</sup> [U/mg]	GA [U]	Spez. Akt. [U/mg]
10	0,75	0,51	0,68	0,82	1,09
25	0,75	0,20	0,27	0,41	0,55
50	1,2	0,07	0,06	0,32	0,27
50 (AZ <sup>1</sup> )	5,5	0,06	0,01	0,22	0,04

<sup>1</sup>AZ: aufgeschlossene Zellen; <sup>2</sup>GA: Gesamtaktivität; <sup>3</sup>Spez. Akt.: spezifische Aktivität

Im Gegensatz zum Spektrum der aufgeschlossenen Zellen mit einem Absorptionsmaximum bei 426 nm wiesen die Spektren der zellfreien Extrakte der Spheroplastierungsansätze vor der Dialyse jeweils ein Maximum bei 346 nm auf (Abb. 32 A).

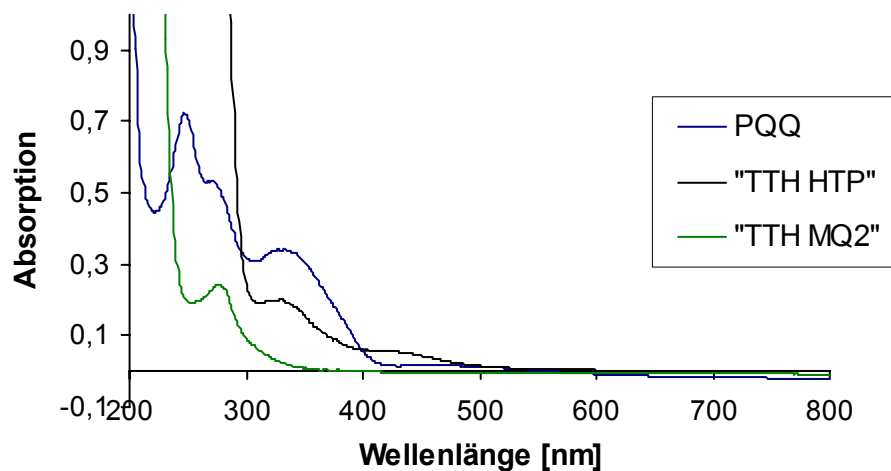


**Abb. 32:** Absorptionsspektren der zellfreien Extrakte nach Spheroplastierung mit 10 mM (10), 25 mM (25) oder 50 mM EDTA (50). **A)** vor Dialyse. **B)** nach Dialyse. AZ: aufgeschlossene Zellen.

Nach der Dialyse blieb das Absorptionsmaximum im Spektrum der aufgeschlossenen Zellen bei 426 nm erhalten, im Gegensatz zu den Spektren der zellfreien Extrakte der Spheroplastierungsansätze, die das Absorptionsmaximum bei 346 nm nicht mehr aufwiesen (Abb. 32 B).

#### 4.2.4 Absorptionsspektren von TTH-Reinigungsfractionen und von PQQ

Um zu untersuchen, ob Pyrrolochinolin-Chinon (PQQ) ein möglicher Cofaktor der TTH ist, wurden Absorptionsspektren von zwei TTH-Fractionen aus der zweiten Reinigung und von PQQ gemessen (Abb. 33).



**Abb. 33:** Absorptionsspektren von TTH-Reinigungsfractionen und von PQQ. PQQ: Pyrrolochinolin-Chinon; „TTH HTP“ und „TTH MQ2“: TTH-Reinigungsfractionen nach Hydroxyapatit- bzw. MonoQ-Chromatographie.

Das Spektrum der TTH-aktiven Fraktion „TTH HTP“, die nach Hydroxyapatit-Chromatographie der cytoplasmatischen Fraktion erhalten wurde, hatte Maxima bei 332 und 426 nm. Das Spektrum von PQQ wies ebenso ein Maximum bei 332 nm auf. Das Spektrum der Fraktion „TTH MQ2“ eines darauf folgenden Reinigungsschrittes hatte ein Maximum bei 280 nm. Daraus wurde geschlossen, dass PQQ ein Cofaktor der TTH sein könnte.

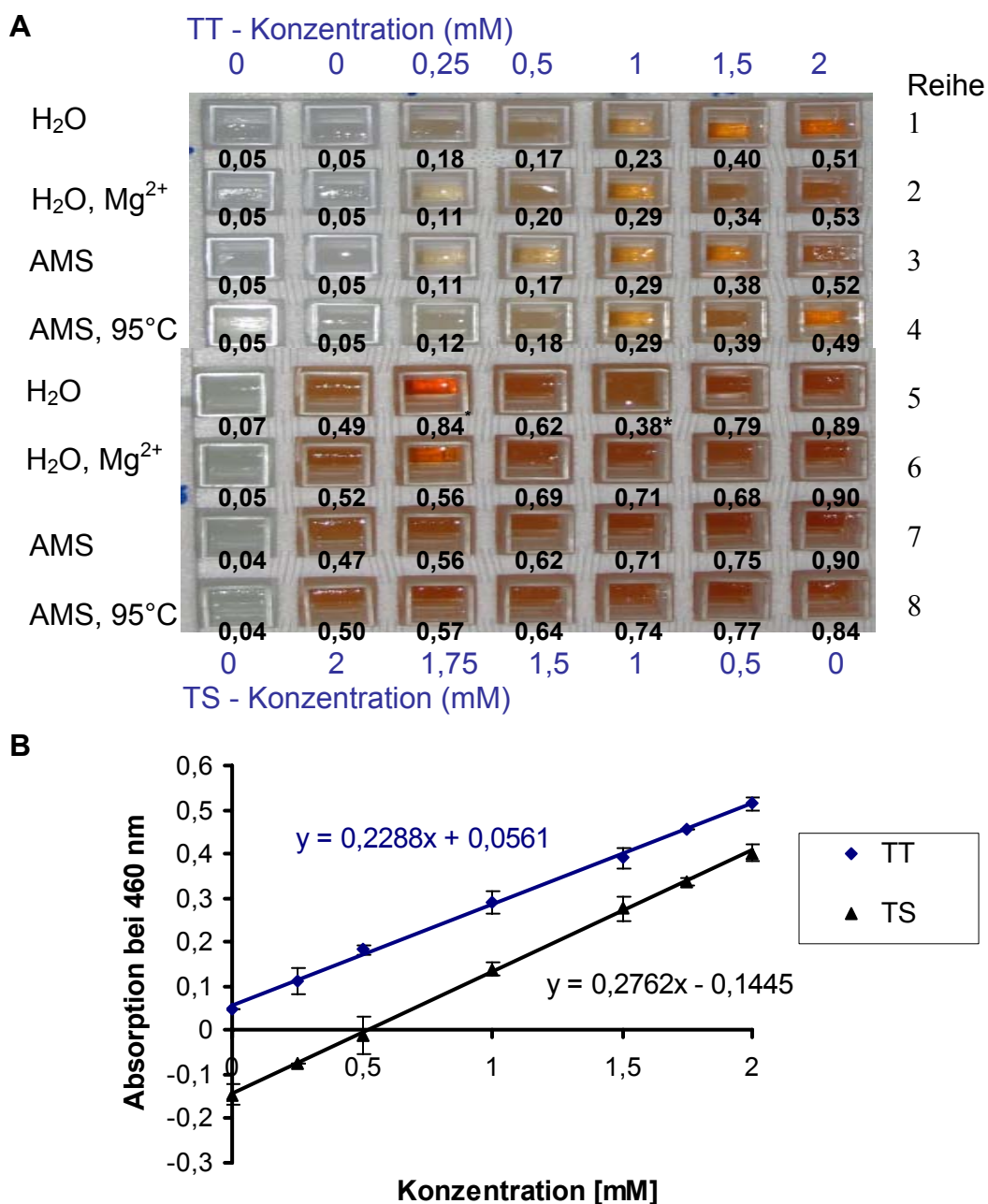
#### 4.2.5 Biochemische Charakterisierung der TTH

##### 4.2.5.1 Messung der TTH-Aktivität

###### 4.2.5.1.1 Cyanolyse: Tetrathionat-/Thiosulfat-Standardreihen

Um Tetrathionat (TT)- und Thiosulfat (TS)-Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten beim TTH-Aktivitätstest durch Cyanolyse zu bestimmen, wurden TT-/TS-Standardreihen mit Konzentrationen von 0 mM bis 2 mM erstellt (Abb. 34). Das bei

der Cyanolyse entstehende Thiocyanat wurde als Thiocyanateisenkomplex photometrisch bei einer Wellenlänge von 460 nm gemessen. Zur Kontrolle der Stabilität von TT und TS bei den Bedingungen des TTH-Aktivitätstests, wurden Standardreihen bei RT in Wasser, in Wasser mit 1 mM Magnesiumchlorid und in 50 mM Ameisensäure (pH 3) angesetzt. Zusätzlich wurden die Standards einer Reihe in Ameisensäure mit 1 mM MgCl für 5 Stunden bei 95°C inkubiert (Abb. 34).



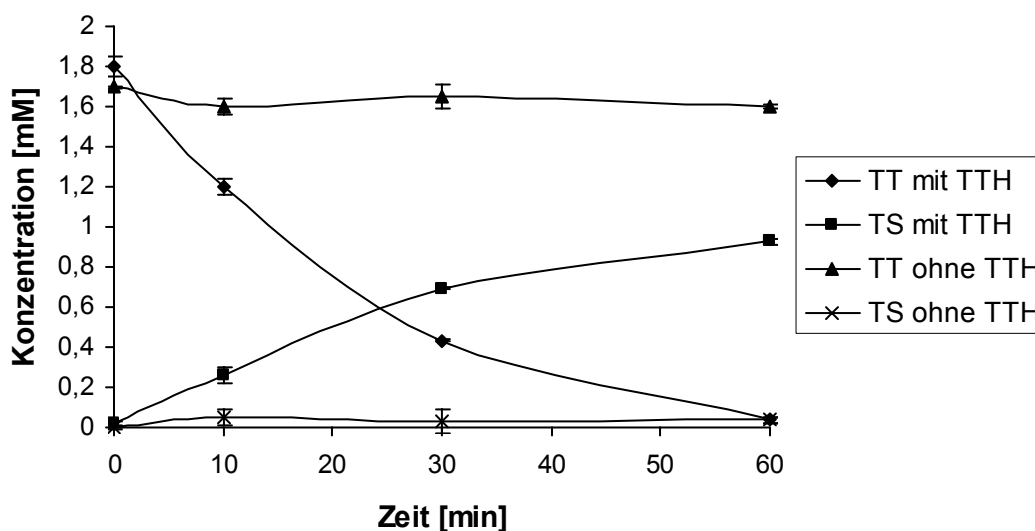
**Abb. 34:** Cyanolyse: TT-/TS-Standardreihen im Bereich 0 bis 2 mM. **A)** Küvetten mit den Cyanolyse-Nachweisreaktionsansätzen für TT (Reihen 1 bis 4) und TS (Reihen 5 bis 8) mit den Standards. Zahlen unter den Küvetten: Absorptionswerte bei 460 nm. AMS: Ameisensäure; \*: Diese Werte wurden für die Berechnungen der Standardreihen nicht verwendet. **B)** Berechnete Regressionsgeraden (Gleichungen). Messpunkte: Mittelwerte aus den Messwerten; Fehlerbalken: Standardabweichung.



Die Absorptionen der Standardreihen zeigten eine lineare Abhängigkeit von den TT- bzw. TS-Konzentrationen, die sich bei der TS-Standardreihe aufgrund der Subtraktion des zweifachen TT-Absorptionswertes bis in den negativen Bereich erstreckten (Abb. 34 B). Die Inkubation bei 95°C führte zu keiner signifikanten Änderung in der Absorption im Vergleich zu den bei RT behandelten Standards. Daraus folgte, dass TT und TS bei den Bedingungen des TTH-Aktivitätstests stabil sind.

#### 4.2.5.1.2 Aktivitätstest

130 µg TTH-Proteinfraktion oder Puffer (ohne TTH) wurden mit Tetrathionat (TT) inkubiert und die TT- und Thiosulfat- (TS) Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten durch Cyanolyse bestimmt (Abb. 35). Der Aktivitätstest erfolgte bei 80°C mit der Eduktkonzentration von 1,8 mM TT. Bei dem Reaktionsansatz mit TTH betrug die TS-Konzentration zu jedem Zeitpunkt in etwa die Hälfte des verbrauchten TTs (Abb. 35). Bei dem Reaktionsansatz ohne TTH blieben die TT- und TS-Konzentrationen nahezu konstant. Die gemessene Aktivität entsprach  $0,46 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ .



**Abb. 35:** Kinetik der TT-Hydrolyse und der TS-Bildung in Reaktionsansätzen mit und ohne TTH.

Um auszuschließen, dass der TT-Verbrauch auf TQO-Aktivität zurückzuführen war, wurden TTH-Aktivitätstests mit gereinigter TQO und TQO-Aktivitätstests mit TTH-Proteinextrakten durchgeführt. TT wurde weder durch die TQO hydrolysiert noch wurde TS durch TTH-Fractionen oxidiert.

Die Inkubation des TTH-Proteinextrakts mit Proteinase K hatte keinen Einfluss auf die Aktivität (Tab. 11). Um auszuschließen, dass die TTH-Aktivität auf DNA- oder RNA-Moleküle zurückzuführen war, wurde TTH-Proteinextrakt mit DNase, RNaseA oder Wasser inkubiert. Nach der Inkubation der Fraktion „TTH MQ2“ mit DNase, RNaseA oder H<sub>2</sub>O betrug die spezifische TTH-Aktivität jeweils 0,7 U (mg Protein)<sup>-1</sup> (Tab. 11). Die Aktivität war also nicht auf DNA- oder RNA-Moleküle zurückzuführen.

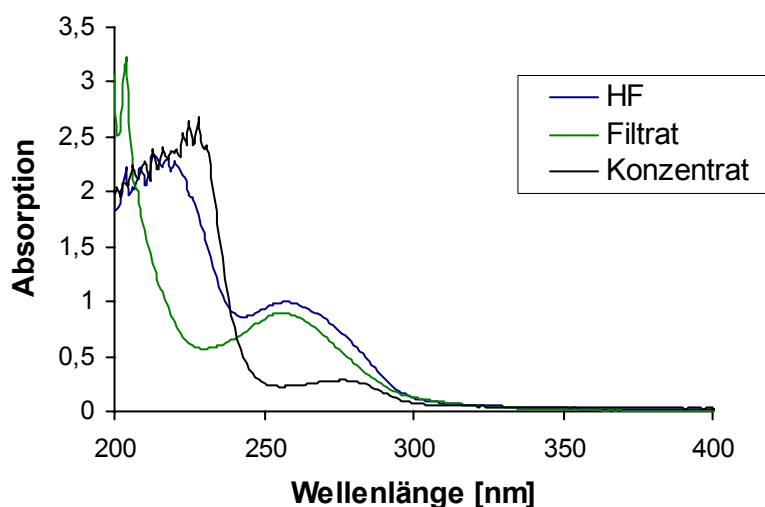
**Tab. 11:** Spezifische TTH-Aktivitäten nach Inkubation mit Protease, Nuklease oder H<sub>2</sub>O

Fraktion	Spezifische Aktivität [U/mg]
„TTH MQ2“ + DNase	0,7
„TTH MQ2“ + RNase	0,7
„TTH MQ2“ + Proteinase K	0,7
„TTH MQ2“ + H <sub>2</sub> O	0,7

„TTH MQ2“: TTH-aktive Fraktion aus dem zweiten Reinigungsversuch der TTH (Kap. 4.2.1.1)

Übereinstimmend damit, dass durch die Inkubation mit RNase keine Reduktion der TTH-Aktivität erfolgte, wurden bei TTH-Aktivitätstests mit isolierter RNA von *A. ambivalens* keine Aktivitäten gemessen.

Um auszuschließen, dass der bei den TTH-Aktivitätstests gemessene TT-Verbrauch vollständig oder teilweise auf niedermolekulare Substanzen zurückzuführen war, wurde der Puffer der Fraktion „TTH Q-Seph. HF“ mit einem Konzentrador (Ausschlussvolumen 30 kDa) ausgetauscht. Die Absorptionsspektren der Ausgangslösung und des Filtrats wiesen jeweils ein Maximum bei 260 nm und der konzentrierten Fraktion ein Maximum bei 280 nm auf (Abb. 36). Die spezifischen



**Abb. 36:** Absorptionsspektren der Fraktion „TTH Q-Seph. HF“ = HF, des Filtrats und des Konzentrats.

TTH-Aktivitäten der Ausgangslösung und des Konzentrats betragen 0,43 und 0,40 U (mg Protein)<sup>-1</sup>. Im Filtrat wurde keine TTH-Aktivität gemessen. Die TTH-Aktivität war also weder vollständig noch teilweise auf niedermolekulare Substanzen zurückzuführen.

Es wurde überprüft, ob *A. ambivalens* unter aeroben oder anaeroben Bedingungen TTH synthetisiert, wenn er mit Schwefel (S<sup>0</sup>) als Substrat wächst. Hierfür wurden TTH-Aktivitätstests mit der cytoplasmatischen und der Membranfraktion durchgeführt (Tab. 12). Die spezifische Aktivität der cytoplasmatischen Fraktion von aerob mit S<sup>0</sup> kultiviertem *A. ambivalens* betrug 0,7 mU (mg Protein)<sup>-1</sup>. Sie war um das 63-fache geringer als in der entsprechenden Fraktion von aerob mit TT kultivierten Zellen (Tab. 12). In der Membranfraktion von aerob mit S<sup>0</sup> gewachsenen Zellen wurde eine Aktivität von 0,09 mU (mg Protein)<sup>-1</sup> gemessen. In den Fraktionen von anaerob gezogenem *A. ambivalens* wurde keine TTH-Aktivität gemessen (Tab. 12). Außerdem wurde untersucht, ob aerob, ohne Schwefel kultiviertes *Sulfolobus solfataricus* oder aerob, mit Schwefel kultiviertes *Sulfurisphaera sp. MC1* TTH produziert. Auch in diesen Mikroorganismen wurden keine TTH-Aktivitäten nachgewiesen (Tab. 12).

**Tab. 12:** Spezifische TTH-Aktivitäten in verschiedenen Fraktionen der unterschiedlich kultivierten Organismen *Acidianus ambivalens*, *Sulfolobus solfataricus* und *Sulfurisphaera sp. MC1*

Spezies	<i>Acidianus ambivalens</i>	<i>A. ambivalens</i>	<i>A. ambivalens</i>	<i>A. ambivalens</i>	<i>A. amb.</i>	<i>A. amb.</i>
Fraktion	CF <sup>1</sup>	MF <sup>2</sup>	CF	MF	CF	MF
Wachstumsbedingung	S <sup>0</sup> ; ANA <sup>4</sup>	S <sup>0</sup> ; ANA	S <sup>0</sup> ; AER <sup>5</sup>	S <sup>0</sup> ; AER	TT <sup>3</sup> ; AER	TT; AER
Spez. Akt. <sup>6</sup> [mU/mg]	0	0	0,7	0,09	44	0,4
GP <sup>7</sup> [mg]	500	110	500	110	500	110
GA <sup>8</sup> TTH [U]	0	0	0,35	0,01	22	0,044
Spezies	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	<i>S. solfataricus</i>	<i>S. solfataricus</i>	<i>Sulfurisphaera sp. MC1</i>	<i>S. sp. MC1</i>	<i>S. sp. MC1</i>
Fraktion	Zellextrakt	CF	MF	Zellextrakt	CF	MF
Wachstumsbedingung	AER	AER	AER	S <sup>0</sup> ; AER	S <sup>0</sup> ; AER	S <sup>0</sup> ; AER
Spez. Akt. [mU/mg]	0	0	0	0	0	0

<sup>1</sup>CF: cytoplasmatische Fraktion; <sup>2</sup>MF: Membranfraktion; <sup>3</sup>TT: Tetrathionat; <sup>4</sup>ANA: anaerob; <sup>5</sup>AER: aerob; <sup>6</sup>Spez. Akt.: spezifische Aktivität; <sup>7</sup>GP: Gesamtprotein; <sup>8</sup>GA: Gesamtaktivität

#### 4.2.5.1.3 Wirkungstest verschiedener Substanzen auf die Aktivität der TTH

Die Wirkung verschiedener Substanzen auf die TTH-Aktivität wurde getestet (Tab. 13). Mit 1 mM  $\text{MgCl}_2$  bzw.  $\text{ZnSO}_4$  erhöhte sich die spezifische Aktivität jeweils um das 1,2 bzw. 1,1-fache im Vergleich zur Aktivität ohne  $\text{MgCl}_2$  oder  $\text{ZnSO}_4$ . Bei 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  verringerte sich die relative Aktivität auf 0,9.

**Tab. 13:** Wirkung verschiedener Substanzen auf die Aktivität der TTH

Substanz	Konzentration	Fraktion	Spezifische Aktivität [U/mg]	Relative Aktivität
keine	---	TTH DE1	0,39	1
$\text{MgCl}_2$	1 mM	TTH DE1	0,47	1,2
$\text{ZnSO}_4$	1 mM	TTH DE1	0,41	1,1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 M	TTH DE1	0,36	0,9
$\text{H}_2\text{O}^*$	---	TTH MQ	2,2	1
SDS*	1%	TTH MQ	0	0
$\text{H}_2\text{O}$	---	TTH ZFE	1,09	1
(EDTA + Saccharose)*	10 mM 18%	TTH ZFE	0,68	0,6
$\text{H}_2\text{O}^*$ (ohne PQQ)	---	TTH MQ2	0,17	1
PQQ*	4 $\mu\text{M}$	TTH MQ2	0,54	3,2

\*: Aktivitäten nach Vorinkubation der TTH mit der (den) jeweiligen Substanz(en)

Nach einer Vorinkubation der TTH mit SDS wurde keine Aktivität gemessen. Nach der Inkubation mit 10 mM EDTA und 18% Saccharose verringerte sich die relative Aktivität auf 0,6. Im Gegensatz dazu war die Aktivität nach Vorinkubation der TTH-Fraktion mit PQQ (Pyrrolochinolin-Chinon) um das 3,2-fache höher als ohne PQQ (Tab. 13).

#### 4.2.5.2 Temperatur- und pH-Abhängigkeit der TTH

Zur Bestimmung der Temperatur-Abhängigkeit der Tetrathionat-Hydrolase (TTH) wurden Aktivitätstests im Bereich von 40 bis 95°C durchgeführt. Die Enzymaktivität stieg bei Erhöhung der Temperatur und betrug maximal 0,5 U  $\text{mg}^{-1}$  bei 95°C (Abb. 37). Das Optimum wurde nicht bestimmt, weil aus technischen Gründen keine Messungen bei Temperaturen höher als 95°C durchgeführt werden konnten. Bei 40°C zeigte die TTH keine Aktivität. Die aus dem Arrhenius Plot berechnete Aktivierungsenergie lag bei 29  $\text{kJ mol}^{-1}$  (Abb. 38).

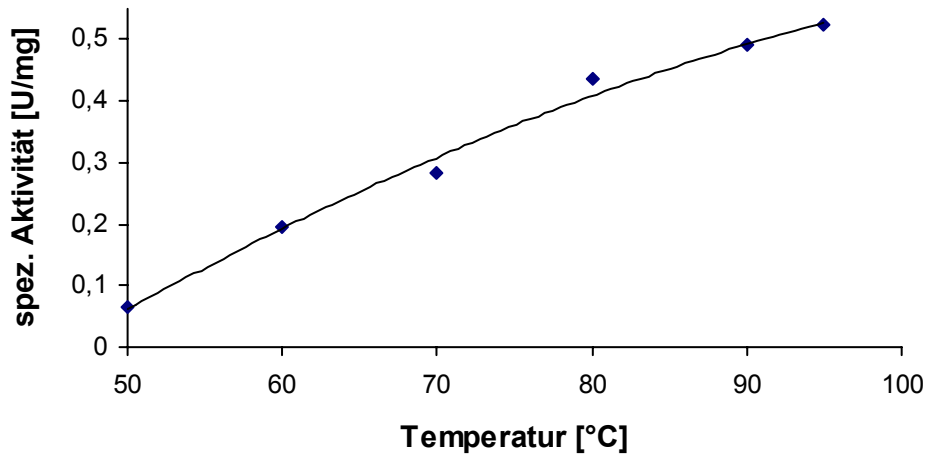


Abb. 37: Temperaturabhängigkeit der TTH.

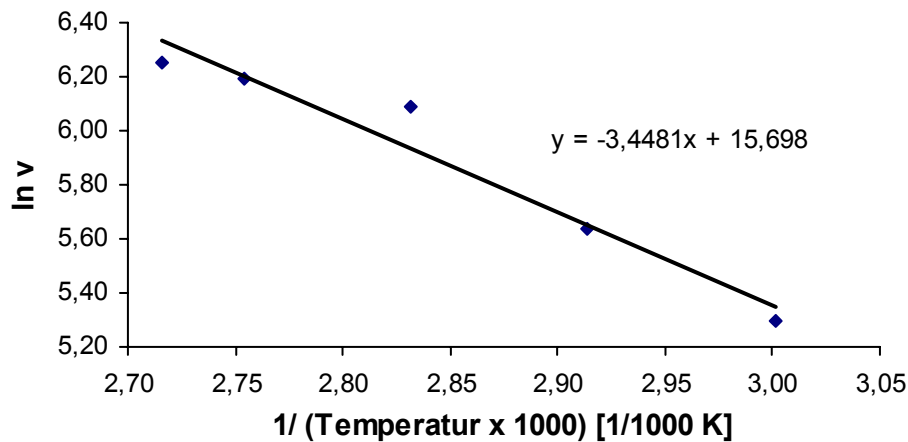


Abb. 38: Arrhenius Plot zur Berechnung der Aktivierungsenergie der TTH-Reaktion. Eingefügte Gleichung: Geradengleichung der Regressionsgerade.  $v$ : Reaktionsgeschwindigkeit,  $K$ : Kelvin.

Der optimale pH-Wert der TTH in Ameisensäure-Puffer lag bei 1, bei welchem die spezifische Aktivität  $2,2 \text{ U mg}^{-1}$  betrug (Abb. 39). Die spezifische Aktivität im pH-Bereich 2 bis 4 lag zwischen 1 und  $0,8 \text{ U mg}^{-1}$ . Bei pH 6 zeigte die TTH keine Aktivität. Der nicht-enzymatische Umsatz von TT im pH-Bereich 1 bis 6 lag zwischen  $0,0006$  und  $0,0024 \text{ } \mu\text{mol/min}$ .

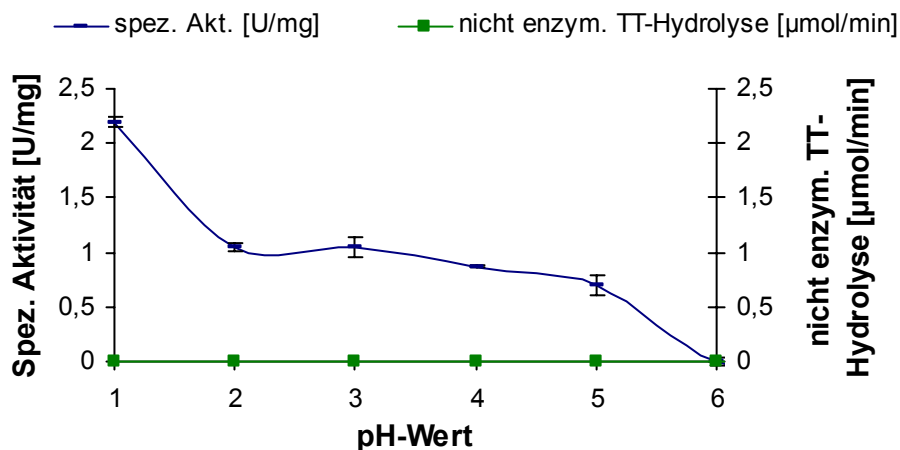
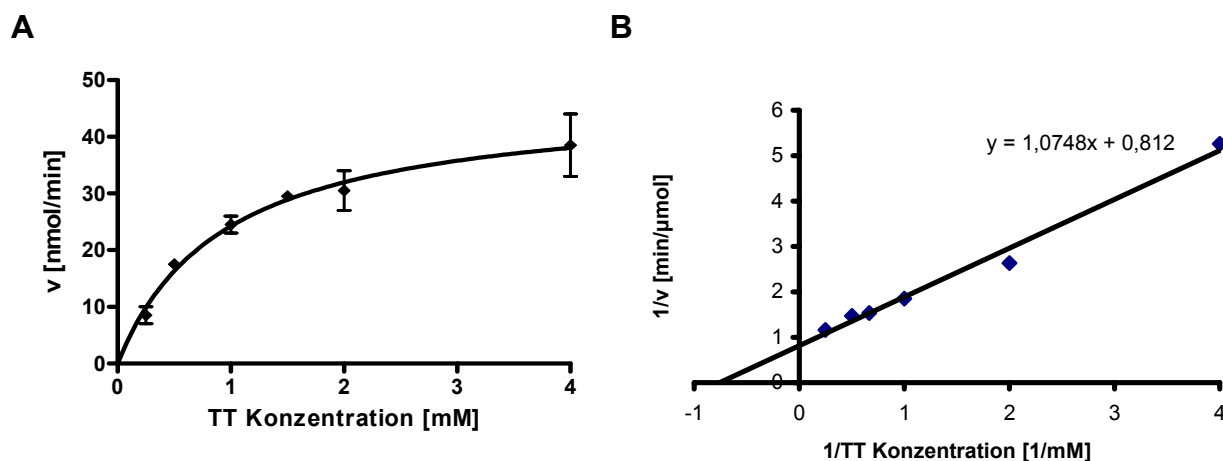


Abb. 39: pH-Abhängigkeit der TTH und des nicht-enzymatischen Umsatzes von TT.

### 4.2.5.3 Bestimmung der kinetischen Konstanten der TTH

Für die Bestimmung von  $K_M$  und  $V_{max}$  wurden Reaktionsgeschwindigkeiten ( $v$ ) der Tetrathionat-Hydrolase (TTH) Reaktion bei verschiedenen TT Konzentrationen (0,25 - 4 mM) ermittelt (Abb. 40 A). Die graphische Analyse durch ein Lineweaver-Burk-Diagramm ergab einen  $K_M$ -Wert von 1,3 mM TT und  $V_{max}$  von 55 mU (Abb. 40 B).



**Abb. 40:** Enzymkinetik der TT-Hydrolase.

**A)** Reaktionsgeschwindigkeit der TTH-Reaktion in Abhängigkeit von der TT-Konzentration.

**B)** Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung von  $K_M$  und  $V_{max}$ .

## 4.3 Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase

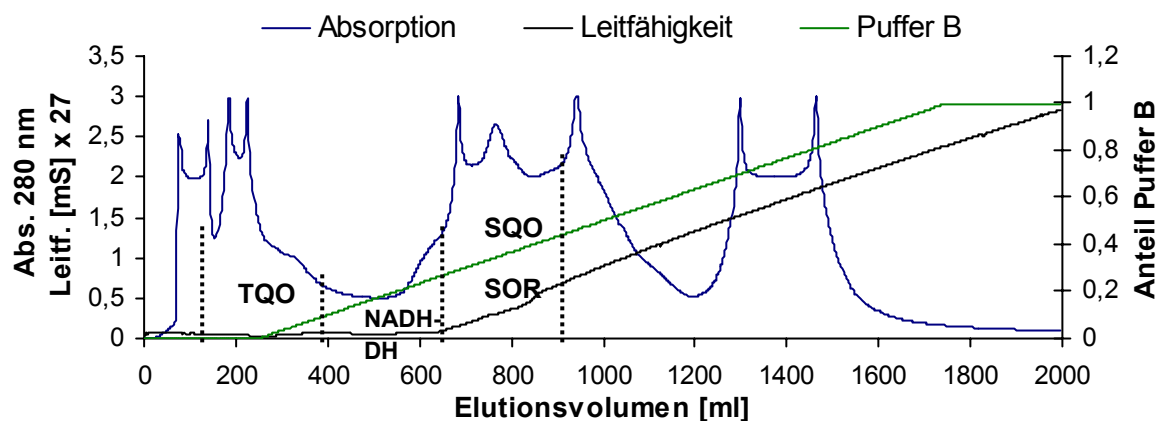
### 4.3.1 Säulenchromatographische Reinigung

Die Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase (SQO)-Aktivität wurde photometrisch mit Decylubichinon als Elektronenakzeptor gemessen. Im löslichen Überstand (cytoplasmatischen Fraktion) von aerob, mit Schwefel ( $S^0$ ) kultivierten *Acidianus ambivalens* Zellen war keine SQO-Aktivität messbar (Tab. 17, Seite 83), während in der Membranfraktion eine spezifische SQO-Aktivität von  $0,32 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$  bestimmt wurde.

In drei säulenchromatographischen Schritten wurde versucht, die SQO aus dem Membransolubilisat (MS) zu reinigen. Zusätzlich zur SQO wurden während der Reinigung die Aktivitäten der TQO (Thiosulfat-Chinon-Oxidoreduktase), der SOR (Schwefel-Oxygenase/-Reduktase) und der NADH-DH (NADH-Dehydrogenase Typ II) in den Fraktionen gemessen. Die bereits bekannte NADH-DH (CAD33806; Gomes *et. al.*, 2001a) war von Interesse, weil diese Sequenzähnlichkeiten zu anderen Sulfid-Chinon-Reduktasen (SQRn) aus anderen Mikroorganismen aufwies (mündliche Mitteilung: Tiago Bandejas) und daher auch SQO-Aktivität aufweisen könnte.

### 1. Schritt: Anionenaustauschchromatographie über DEAE-Sepharose

Die Trennung der solubilisierten Membranproteine erfolgte zuerst durch DEAE-Anionenaustauschchromatographie. Hierbei wurden TQO, NADH-DH und SQO voneinander getrennt und jeweils nacheinander in verschiedenen Fraktionen gesammelt (Abb. 41; Tab. 14).



**Abb. 41:** Elutionsdiagramm der DEAE-Anionenaustauschchromatographie der mit Dodecylmaltosid solubilisierten Membranproteine. TQO: Thiosulfat-Chinon-Oxidoreduktase, NADH-DH: NADH-Dehydrogenase, SOR: Schwefel-Oxygenase/-Reduktase, SQO: Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase.

**Tab. 14:** Spezifische Aktivitäten der SQO, der SOR, der TQO und der NADH-DH in den Fraktionen der DEAE-Anionenaustauschchromatographie der solubilisierten Membranproteine (MS)

EV <sup>1</sup> [ml] (Fraktion)	MS <sup>2</sup>	0-150 (1)	150-400 (2)	400-680 (3)	680-900 (SQO DE)	900- 1200 (5)	1200- 1600 (6)
GP <sup>3</sup> [mg]	1600	71	107	78	462	305	545
GA <sup>4</sup> TQO [U]	3040	0	1519	0	0	0	0
Spez. Akt. <sup>5</sup> TQO [U/mg]	1,9	0	14,2	0	0	0	0
GA NADH-DH [U]	6560	0	0	889	0	0	0
Spez. Akt. NADH-DH [U/mg]	4,1	0	0	11,4	0	0	0
GA SQO [U]	896	0	0	0	878	0	0
Spez. Akt. SQO [U/mg]	0,56	0	0	0	1,9	0	0
GA SOR [U]	32	0	0	0	13,9	0	0
Spez. Akt. SOR [U/mg]	0,02	0	0	0	0,03	0	0

<sup>1</sup>EV: Elutionsvolumen; <sup>2</sup>MS: Membransolubilisat; <sup>3</sup>GP: Gesamtprotein; <sup>4</sup>GA: Gesamtaktivität; <sup>5</sup>Spez. Akt.: spezifische Aktivität

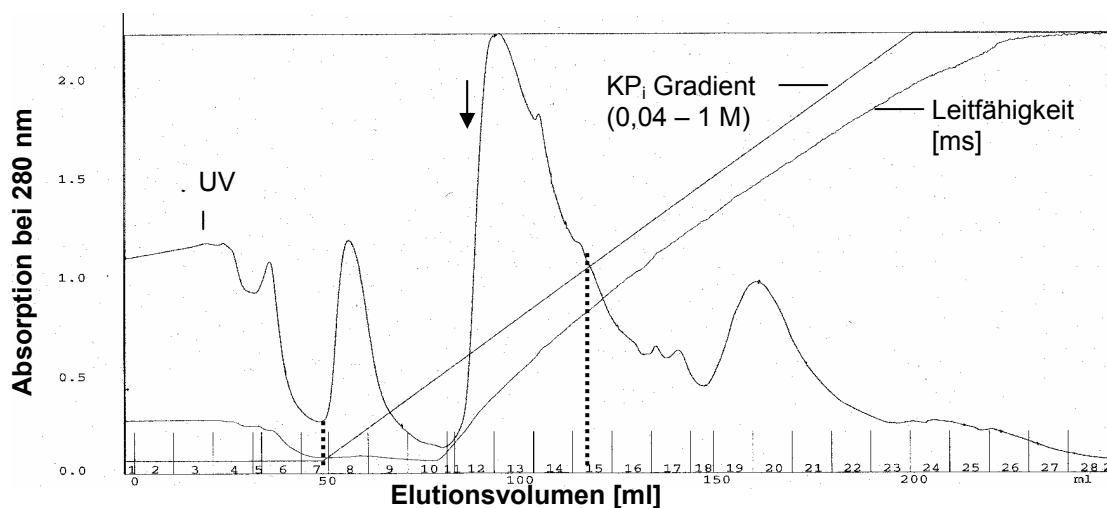
Die Elution der SQO und der SOR erfolgte gleichzeitig ab einer NaCl Konzentration von 270 mM (Elutionsbereich: 680 - 900 ml, Abb. 41). Die spezifische SQO-Aktivität in der Fraktion, genannt „SQO DE“, betrug 1,9 U/mg (878 Units insgesamt; Tab. 14)

und die spezifische SOR-Aktivität 0,03 U/mg (13,9 Units insgesamt; Tab. 14). TQO hatte nicht an die DEAE-Sepharose gebunden (Elution im Auftragsgipfel, Abb. 41). Die spezifische TQO-Aktivität betrug 14,2 U/mg und die Gesamtaktivität 1519 Units (Tab. 14). NADH-DH (11,4 U/mg; 889 Units insgesamt; Tab. 14) wurde ab 130 mM NaCl eluiert (Abb. 41).

## 2. Schritt: Hydroxyapatit (HTP)-Chromatographie

Im zweiten Reinigungsschritt wurden die Proteine der Fraktion „SQO DE“ durch Hydroxyapatit (HTP)-Chromatographie getrennt. SQO und SOR wurden gleichzeitig im Bereich von 45 bis 114 ml eluiert (Abb. 42). Die spezifischen SQO-Aktivitäten der Fraktionen lagen im Bereich von 1,8 bis 20 U (mg Protein)<sup>-1</sup> und die spezifischen SOR-Aktivitäten im Bereich von 0,03 bis 0,18 U/mg (Tab. 15).

Im SDS-Gel wiesen die Fraktionen mit SQO- und SOR-Aktivität komplexe Proteinbandenmuster auf (Abb. 43). Deutlich erkennbar war die typische Proteinbande der SOR-Untereinheit bei 35 kD. Die Fraktionen mit SQO-Aktivität wurden zur Fraktion „SQO HTP“ vereint. Die spezifische SQO-Aktivität betrug 4 U/mg (Gesamtaktivität 352 U) und die spezifische SOR-Aktivität U/mg (Gesamtaktivität 5,3 U; Tab. 17).



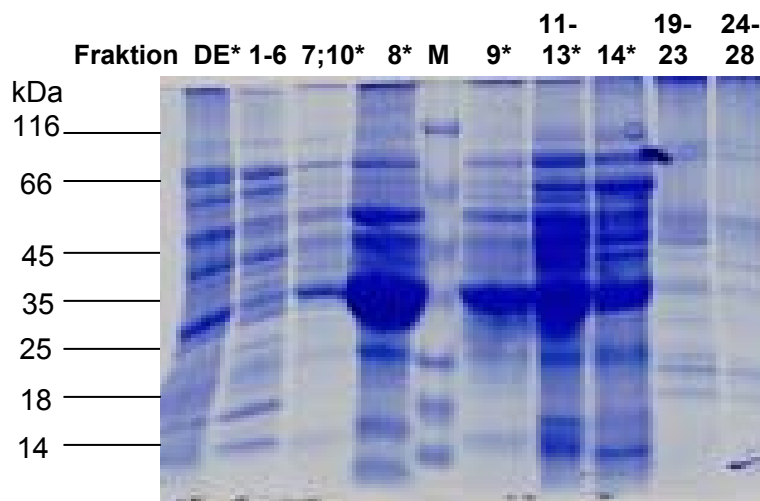
**Abb. 42:** Elutionsdiagramm der HTP-Chromatographie der Fraktion „SQO DE“; gestrichelte Linien, Pfeil: Elutionsbereich, in dem SQO und SOR eluiert wurden.



**Tab. 15:** Spezifische und Gesamtaktivitäten der SQO und der SOR in den Fraktionen der Hydroxyapatit-Chromatographie

Fraktion	1-6	7+10	8	9	11-13	14	15-18	19-23	24-28
EV <sup>1</sup> [ml]	0-45	45-52 + 72-82	52-62	62-72	82-104	104-114	114-150	150-200	200-250
GP <sup>2</sup> [mg]	38	5	10	5	44	24	27	23	10
GA <sup>3</sup> SQO [U]	0	100	52	53	79	66	0	0	0
Spez. Akt. <sup>4</sup> SQO [U/mg]	0	20	5,2	10,6	1,8	2,8	0	0	0
GA SOR [U]	0	0,9	1,0	0,8	1,9	0,8	0	0	0
Spez. Akt. SOR [U/mg]	0	0,18	0,1	0,16	0,04	0,03	0	0	0

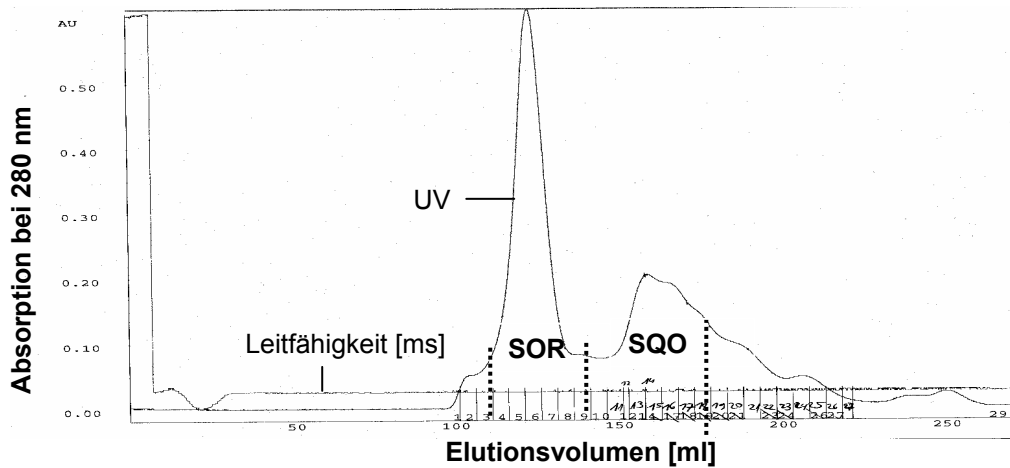
<sup>1</sup>EV: Elutionsvolumen; <sup>2</sup>GP: Gesamtprotein; <sup>3</sup>GA: Gesamtaktivität; <sup>4</sup>Spez. Akt.: spezifische Aktivität



**Abb. 43:** Coomassie gefärbtes SDS-Gel mit Fraktionen nach HTP-Chromatographie. \*: Fraktionen mit SQO- und SOR-Aktivität, DE: Fraktion „SQO DE“, M: Protein Marker (# SM0431).

### 3. Schritt: Gelfiltrationschromatographie (Surperdex S-200)

Im dritten Reinigungsschritt wurden 30 mg Protein der Fraktion „SQO HTP“ durch Gelfiltrationschromatographie getrennt. SQO wurde im Bereich von 135 bis 174 ml eluiert (Abb. 44). Die spezifischen SQO-Aktivitäten der Fraktionen lagen im Bereich von 4,5 bis 5,3 U (mg Protein)<sup>-1</sup> (Tab. 16). Die SOR wurde von der SQO getrennt und eluierte im Bereich von 105 bis 135 ml (Abb. 44). Die spezifische SOR-Aktivität lag bei 0,12 U/mg (Tab. 16). Die Fraktionen mit SQO-Aktivität wiesen zudem komplexe Proteinbandenmuster auf (Abb. 45). Sie wurden zur Fraktion „SQO S200“ vereint. Die spezifische SQO-Aktivität betrug 4,9 U/mg (Gesamtaktivität 30 U; Tab. 17). Die berechnete Ausbeute war 9,8 % der Gesamtaktivität des Membransolubilisats und 18 mg Protein. Der Reinigungsfaktor lag bei 8,8 (Tab. 17).

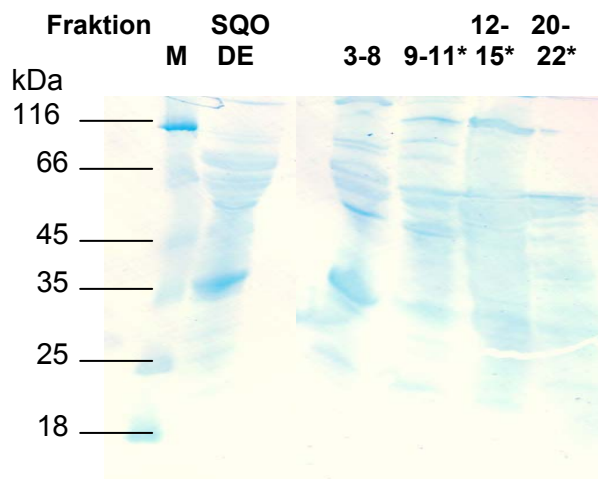


**Abb. 44:** Elutionsdiagramm der Gelfiltrationschromatographie (S-200) der Fraktion „SQO HTP“.

**Tab. 16:** Spezifische SQO-Aktivitäten nach Gelfiltrationschromatographie (S-200)

Fraktion	2	3-8	9-11	12-15	16;17	18;19	20-22	23-26	29
EV <sup>1</sup> [ml]	100-105	105-135	135-150	150-162	162-172	172-182	182-197	197-217	245-255
Spez. Akt. <sup>2</sup> SQO [U/mg]	0	0	4,5	4,8	5,3	0	0	0	0
GP <sup>3</sup> [mg]	0,3	15	1,5	2,4	2,2	1,5	1,5	2	3
GA <sup>4</sup> SQO [U]	0	0	6,8	11,5	11,7	0	0	0	0
Spez. Akt. SOR [U/mg]	0	0,12	0	0	0	0	0	0	0

<sup>1</sup>EV: Elutionsvolumen; <sup>2</sup>Spez. Akt.: spezifische Aktivität; <sup>3</sup>GP: Gesamtprotein; <sup>4</sup>GA: Gesamttaktivität



**Abb. 45:** Coomassie gefärbtes SDS-Gel mit Fraktionen nach Gelfiltrationschromatographie (S-200). \*: Fraktionen mit SQO-Aktivität, M: Protein Marker (# SM0431).

**Tab. 17:** Reinigungstabelle der Reinigung einer SQO

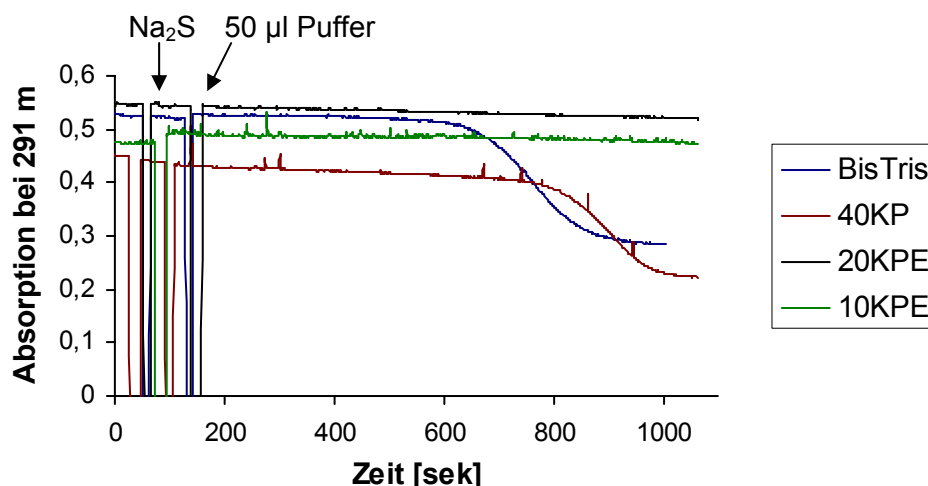
Reinigungs- fraktion	Gesamt- protein [mg]	Gesamt- aktivität SQO [U]	Spezi- fische SQO- Aktivität [U/mg]	Gesamt- aktivität SQO in %	Reini- gungs- faktor SQO	Gesamt- aktivität SOR [U]	Spezi- fische SOR- Aktivität [U/mg]	Gesamt- aktivität SOR in %	Reini- gungs- faktor SOR
Löslicher Überstand (Cytoplasma)	8290	0	0	---	---	17409	2,1	---	---
Membranfraktion	2400	768	0,32	---	---	36	0,015	100	1
Membran- solubilisat	1600	896	0,56	100	1	32	0,02	89	1,3
<b>1. DEAE</b>									
SQO DE	462	878	1,9	98	3,4	13,9	0,03	39	2
<b>2. HTP</b>									
SQO HTP	88	352	4,0	39	7,1	5,3	0,06	15	4
Berechnete Werte <sup>a</sup>	203	813	---	91	---	12,2	---	34	---
<b>3. S-200</b>									
SQO S200	6,1	30	4,9	3,3	8,8	0,7	0,12	2	8
Berechnete Werte <sup>a</sup>	18	88	---	9,8	---	2,2	---	6	---

a: Es wurde jeweils nur ein Teil der zuvor erhaltenen Fraktion verwendet. Die berechneten Werte ergaben sich jeweils durch Hochrechnung auf die theoretisch erhaltene Gesamtproteinmenge bei Verwendung der gesamten Fraktion.

### 4.3.2 SQO-Aktivitätsmessung mit Decylubichinon

SQO-Aktivität (Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase) wurde mit Decylubichinon (DQ) photometrisch bei 291 nm und 70°C gemessen. Aufgrund der hohen Temperatur und der Reaktivität des Substrates Natriumsulfid ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) wurde eine nicht-enzymatische Reduktion von DQ (Hintergrundsreaktion) gemessen (Abb. 46, Tab. 18). Daher wurden vier Reaktionspuffer (RP) getestet, um Bedingungen zu finden, bei denen die Hintergrundsreaktion nach der Zugabe von proteinfreien Säulenchromatographiepuffer sehr gering war (Abb. 46, Tab. 18). Die Endkonzentration von  $\text{Na}_2\text{S}$  war 1 mM und von DQ 62  $\mu\text{M}$ .

Die höchste Hintergrundsreaktion wurde in BisTris gemessen. Sie hatte einen sigmoidalen Verlauf und betrug 0,6  $\text{nmol min}^{-1}$  während der ersten 7,8 Minuten nach der Zugabe des Puffers. Danach erhöhte sie sich um das 20-fache auf 12  $\text{nmol min}^{-1}$  (Abb. 46, Tab. 18). In 40 mM Kaliumphosphatpuffer (40KP) wurde eine etwas geringere Hintergrundsreaktion gemessen. Sie verlief ebenfalls sigmoidal und betrug 0,4  $\text{nmol min}^{-1}$  während der ersten 10 Minuten nach der Zugabe des Puffers. Danach erhöhte sich die Rate der DQ-Reduktion um das 22-fache auf 8,9  $\text{nmol min}^{-1}$  (Abb. 46, Tab. 18).



**Abb. 46:**  $\text{Na}_2\text{S}$ -abhängige nicht-enzymatische DQ-Reduktion (Hintergrundsreaktion) bei  $70^\circ\text{C}$  in verschiedenen Reaktionspuffern. Puffer: proteinfreier Säulenchromatographiepuffer. Die Zugabe von  $\text{Na}_2\text{S}$  erfolgte zwischen 0 und 60 Sekunden (Lücke in der Messung; Bei 10 KPE erfolgte die Zugabe von  $\text{Na}_2\text{S}$  vor der Messung). Die Zugabe des proteinfreien Puffers erfolgte zwischen 80 und 150 Sekunden.

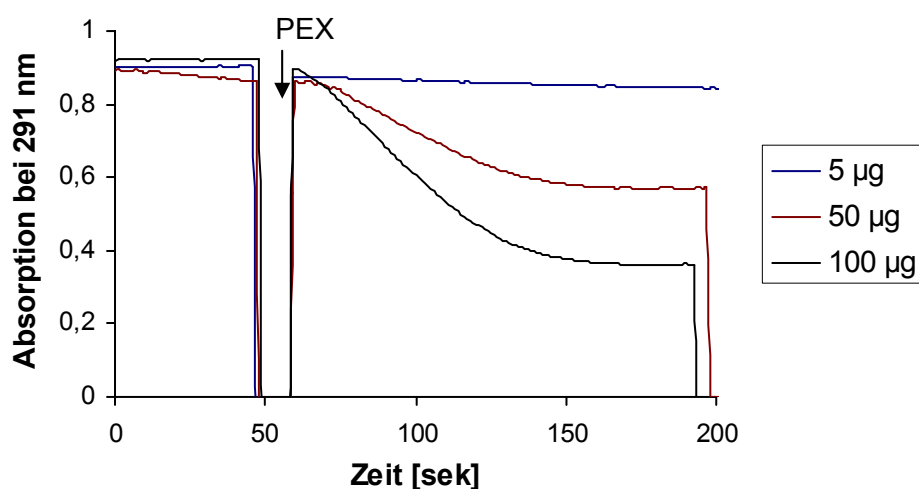
EDTA und eine geringere  $\text{KPi}$  Konzentration bewirkten eine Verringerung der Hintergrundsreaktion. Eine starke Beschleunigung der Reaktion trat nicht mehr auf. In 20 mM Kaliumphosphatpuffer mit EDTA (20KPE) war die maximale  $\text{Na}_2\text{S}$ -abhängige Reduktion von DQ  $0,36 \text{ nmol min}^{-1}$  (Abb. 46, Tab. 18). Die geringste Hintergrundsreaktion wurde in 10KPE mit maximal  $0,3 \text{ nmol min}^{-1}$  gemessen (Tab. 18). Daher wurden SQO-Aktivitätsmessungen in 10KPE durchgeführt.

**Tab. 18:**  $\text{Na}_2\text{S}$ -abhängige nicht-enzymatische DQ-Reduktion (Hintergrundsreaktion) bei  $70^\circ\text{C}$  in verschiedenen Reaktionspuffern

Reaktionspuffer <sup>a</sup>				Absorptionsänderung [dA/min]	DQ-Reduktion [nmol/min]
Nr.					
1	BisTris	50 mM BisTris	Initial	-0,003	0,6
			Maximal <sup>b</sup>	-0,06	12
2	40KP	40 mM $\text{KPi}$	Initial	-0,002	0,4
			Maximal <sup>c</sup>	-0,045	8,9
3	20KPE	20 mM $\text{KPi}$ , 1 mM EDTA	Initial	-0,0018	0,36
			Maximal <sup>d</sup>	-0,0013	0,26
4	10KPE	10 mM $\text{KPi}$ , 2 mM EDTA	Initial	-0,00015	0,03
			Maximal <sup>d</sup>	-0,0015	0,3

a: Vollständige Zusammensetzung der Puffer in Kap. 3.16.4. Initial: Im Zeitraum von 400 bis 600 sek; b: 700-760 sek; c: 810-800 sek; d: 750-850 sek.

Um zu untersuchen, ob die  $\text{Na}_2\text{S}$ -abhängige DQ-Reduktion nach Proteinzugabe enzymatisch bedingt war, wurden Aktivitäten mit unterschiedlichen Proteinextraktmengen (5; 50; 100  $\mu\text{g}$ ) gemessen (Tab. 19, Abb. 47).



**Abb. 47:** Photometrische Aktivitätsmessungen mit  $\text{Na}_2\text{S}$ , DQ und verschiedenen Mengen Proteinextrakt (PEX).

Die Aktivität erhöhte sich proportional zur Proteinextraktmenge. Sie betrug 0,004 Units (U) mit 5  $\mu\text{g}$  Proteinextrakt (PEX), 0,05 U mit 50  $\mu\text{g}$  PEX und 0,09 mit 100  $\mu\text{g}$  PEX. Die durchschnittliche spezifische Aktivität betrug  $0,9 \pm 0,1$  U/mg. Daraus wurde geschlossen, dass die gemessene Aktivität auf eine Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase (SQO) zurückzuführen war.

**Tab. 19:** SQO Aktivitäten mit Decylubichinon

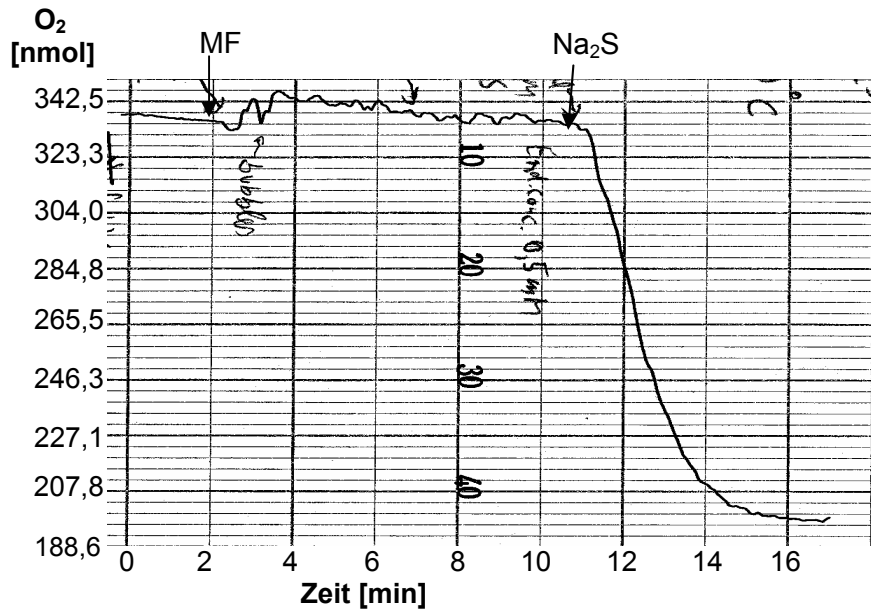
Proteinextraktmenge [ $\mu\text{g}$ ]	dA/min <sup>1</sup>	Aktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]
5	-0,02	0,004	0,8
50	-0,25	0,050	1
100	-0,47	0,093	0,9

<sup>1</sup>dA/min: Steigung der Absorptionsänderung pro Minute

#### 4.3.3 $\text{Na}_2\text{S}$ -abhängige Sauerstoffreduktionsaktivität der Membranfraktion (MF)

Um zu untersuchen, ob ein katalysierter Elektronentransport durch die intakte Membranfraktion (MF) von *Acidianus ambivalens* von Sulfid auf Sauerstoff stattfindet, wurden Aktivitätsmessungen mit einer Sauerstoffelektrode durchgeführt. Die intrinsische Sauerstoffreduktionsaktivität der MF bei 50°C betrug  $1,4 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} (\text{mg Gesamtprotein})^{-1}$  (Abb. 48). Die Aktivität erhöhte sich nach der Zugabe von 0,5 mM Natriumsulfid um das 41-fache auf maximal  $57,8 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ .

1.



**Abb. 48:** Sauerstoffreduktion durch intakte Membranfraktion = MF (1 mg Gesamtprotein) vor und nach der Zugabe von 0,5 mM Natriumsulfid ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) bei  $50^\circ\text{C}$ .

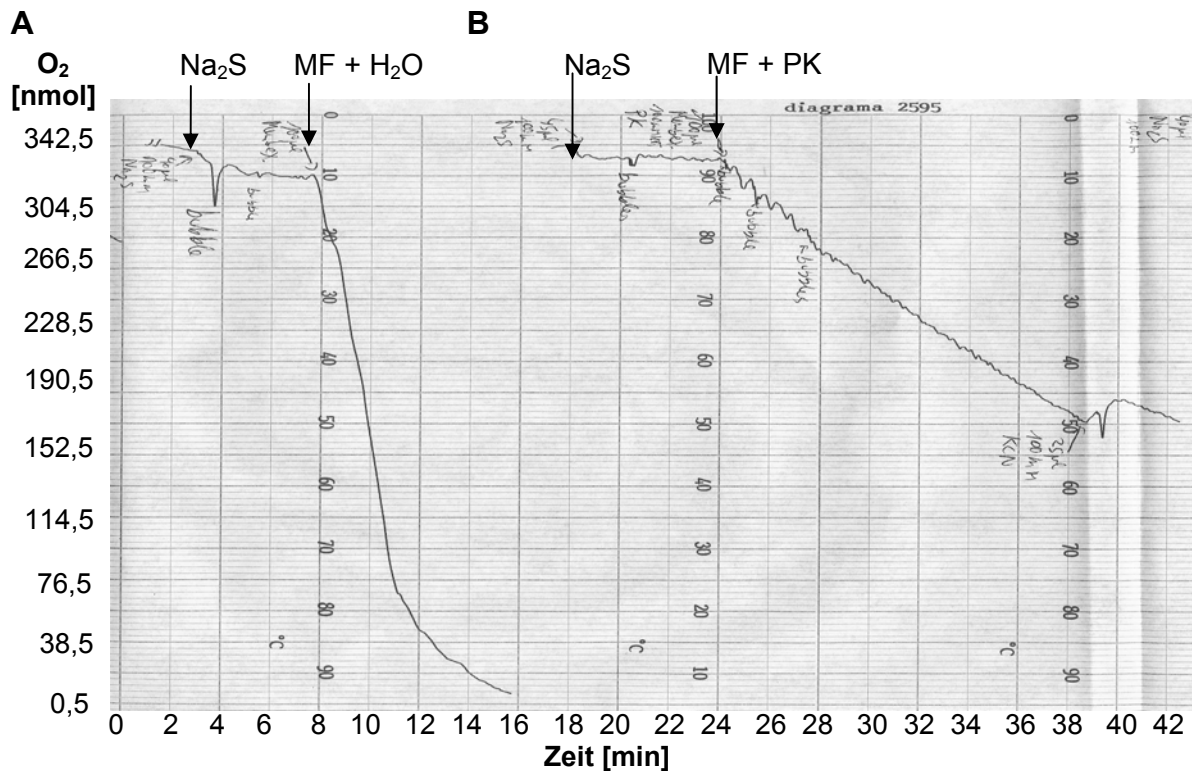
Als Kontrolle, ob die Sauerstoffreduktion von der MF abhängig war, wurden unterschiedliche Mengen MF bei einer  $\text{Na}_2\text{S}$ -Konzentration von 0,5 mM verwendet. Die Aktivität stieg proportional zur Gesamtproteinmenge (Tab. 20). Die durchschnittliche spezifische Aktivität der Sauerstoffreduktion bei  $50^\circ\text{C}$  betrug  $49,9 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} (\text{mg Gesamtprotein})^{-1}$ . Daraus wurde geschlossen, dass die gemessene Aktivität von der MF abhängig war.

**Tab. 20:** Aktivitäten mit 0,5 mM  $\text{Na}_2\text{S}$  und verschiedenen Proteinmengen

GP MF <sup>1</sup> [mg]	Aktivität [nmol $\text{O}_2$ /min]	Spez. Akt. [nmol $\text{O}_2 \text{ min}^{-1} (\text{mg GP})^{-1}$ ]
3	$147 \pm 11$	$49 \pm 4$
1,5	73	48,7
0,5	26,4	52,8

<sup>1</sup>GP MF: Gesamtprotein Membranfraktion

Zur Kontrolle, ob die  $\text{Na}_2\text{S}$ -abhängige Sauerstoffreduktion durch die MF enzymatisch bedingt war, wurden Aktivitätsmessungen durchgeführt, nachdem die MF entweder mit Proteinase K oder mit Wasser behandelt worden war (Abb. 49). Nach der Inkubation der MF mit Proteinase K betrug die Rate der Sauerstoffreduktion  $10 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1}$ . Die Rate der Sauerstoffreduktion der mit Wasser behandelten MF betrug  $70,3 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1}$  und war somit um das 7-fache größer als nach der Behandlung mit Proteinase K (Abb. 49).



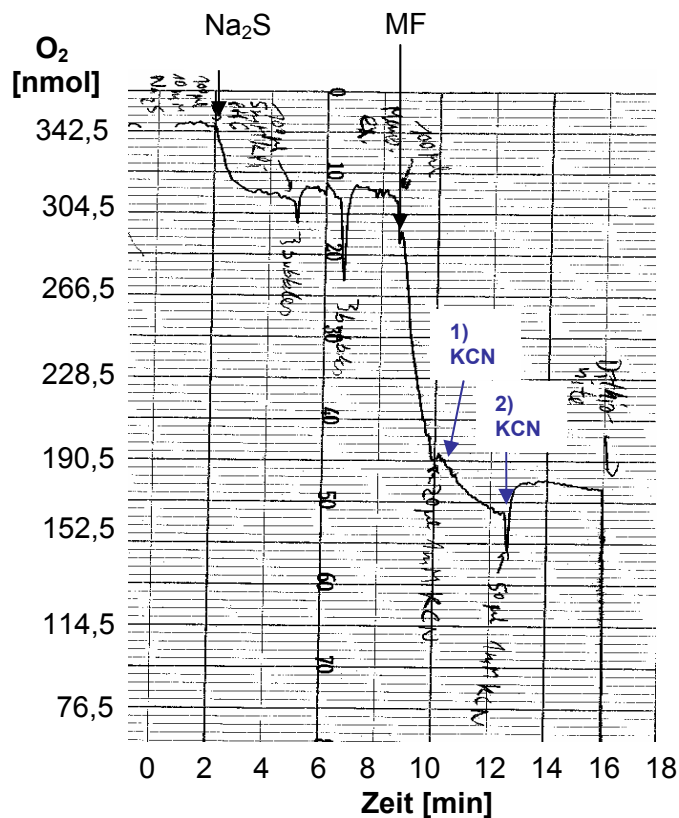
**Abb. 49:** Na<sub>2</sub>S-abhängige Sauerstoffreduktion **(A)** durch intakte Membranfraktion (MF+ H<sub>2</sub>O) und **(B)** mit Proteinase K (PK) behandelte MF.

Daraus wurde geschlossen, dass die gemessene Aktivität zum größten Teil enzymatisch bedingt war.

#### 4.3.3.1 Inhibitionsversuche mit KCN, HQNO und Stigmatellin

Kaliumcyanid (KCN) inhibiert die terminale Chinoloxidase von *A. ambivalens* (Anemüller *et al.*, 1994) und die Sulfid:Chinon-Oxidoreduktasen (SQRn) von verschiedenen Bakterien (*R. capsulatus*, *A. vinosum*, *O. limnetica*, *C. limicola*; Griesbeck *et al.*, 2000). HQNO (Heptylhydroxyquinoline-N-oxide) und Stigmatellin sind Chinon-Analoga und bekannte Inhibitoren von bakteriellen SQRn (Griesbeck *et al.*, 2000).

Die spezifische S<sup>2-</sup>-abhängige Aktivität der Sauerstoffreduktion bei 50°C mit 3 mg Gesamtprotein der MF und 0,5 mM Natriumsulfid betrug 53 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> (mg Gesamtprotein)<sup>-1</sup> (Abb. 50). Nach der Zugabe von 10 μM KCN war sie auf 4,9 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> (mg Gesamtprotein)<sup>-1</sup> (9,2%) und einer weitem Zugabe von 25 μM KCN auf 0,63 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> (mg Gesamtprotein)<sup>-1</sup> bzw. 1,2% des Ausgangswertes gesunken (Abb. 50).

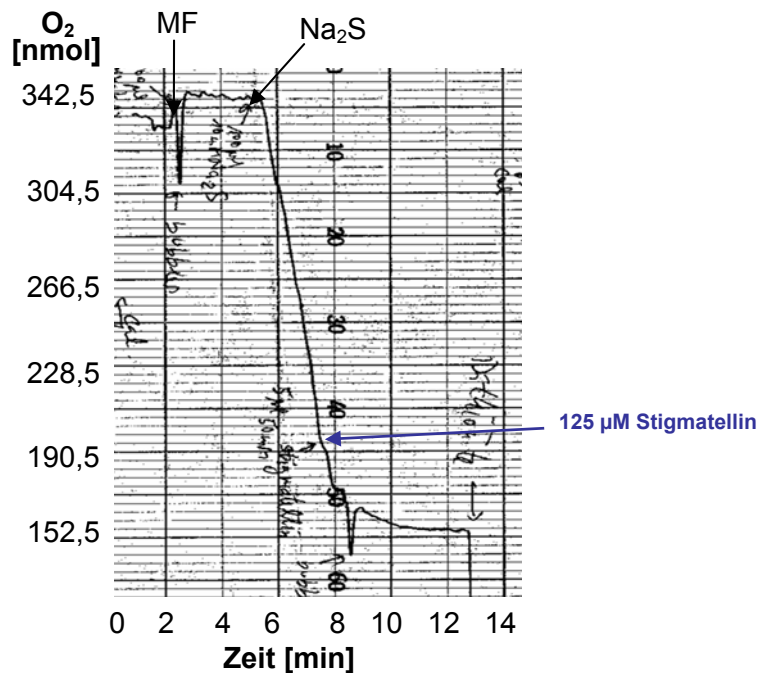


**Abb. 50:** Na<sub>2</sub>S-abhängige Sauerstoffreduktion durch die Membranfraktion von *A. ambivalens* vor und nach der Zugabe von KCN bei 50°C. MF: Membranfraktion (3 mg Gesamtprotein), KCN: Kaliumcyanid, 1) KCN: Zugabe von 20 µl 1 mM KCN (Endkonzentration = 10 µM) nach 10 min, 2) KCN: Zugabe von 50 µl 1 mM KCN (Endkonzentration = 25 µM) nach 12,3 min.

Vor der Zugabe von 125 µM Stigmatellin betrug die spezifische Aktivität 56,5 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> (mg Gesamtprotein)<sup>-1</sup> (Abb. 51). Nach der Zugabe ist sie auf 0,6 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> (mg Gesamtprotein)<sup>-1</sup> bzw. 1,1% des Ausgangswertes gesunken (Abb. 51).

Nach der Vorinkubation der MF mit 600 µM HQNO betrug die spezifische Aktivität 7,6 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> (mg Gesamtprotein)<sup>-1</sup> (14% des maximalen Wertes) bei 50°C und 0,5 mM Natriumsulfid (nicht gezeigt). Die Inhibition der Na<sub>2</sub>S-abhängigen Sauerstoffreduktion der Membranfraktion durch KCN, Stigmatellin und HQNO deutete darauf hin, dass ein Elektronentransport von Sulfid auf Sauerstoff stattfindet, der durch die SQO und die terminale Oxidase katalysiert wird.



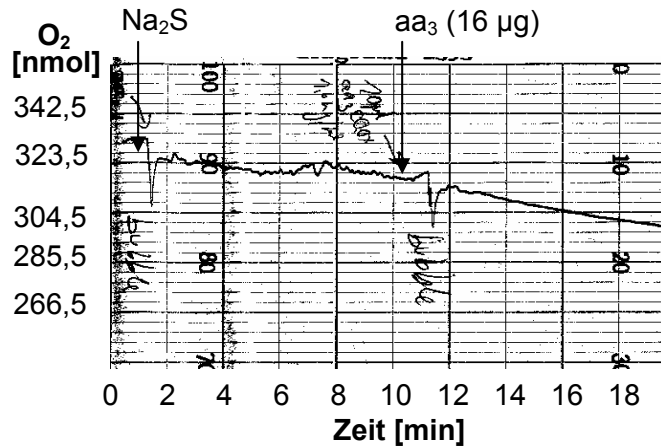


**Abb. 51:**  $\text{Na}_2\text{S}$ -abhängige Sauerstoffreduktion durch die Membranfraktion von *A. ambivalens* vor und nach der Zugabe von **Stigmatellin** bei  $50^\circ\text{C}$ . Nach 2,4 min erfolgte die Zugabe von 1,2 mg Gesamtprotein der Membranfraktion (MF) in den Reaktionsansatz. Nach 5 min wurden 0,5 mM  $\text{Na}_2\text{S}$  hinzugegeben. Eine Zugabe von 125  $\mu\text{M}$  Stigmatellin erfolgte nach 7,4 min.

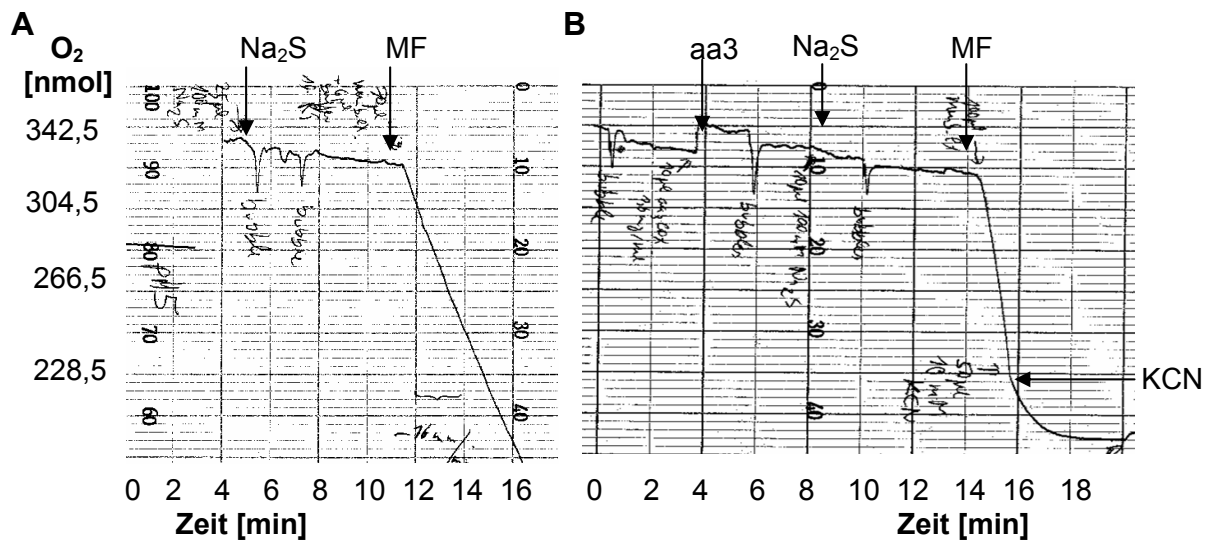
#### 4.3.3.2 $\text{Na}_2\text{S}$ -abhängige Sauerstoffreduktionsaktivität von gereinigter terminaler Oxidase von *A. ambivalens* alleine und zusammen mit der MF

Schwefelwasserstoff reduziert die terminale Oxidase von *A. ambivalens* (Bandeiras, 2005). Daher wurden Aktivitätsmessungen mit gereinigter terminaler Oxidase und Natriumsulfid ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) entsprechend den Messungen mit  $\text{Na}_2\text{S}$  und MF durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine Sauerstoffreduktion stattfindet und die gemessene  $\text{Na}_2\text{S}$ -abhängige Sauerstoffreduktionsaktivität durch die Membranfraktion (MF) von der terminalen Oxidase alleine abhängig war.

Die  $\text{Na}_2\text{S}$ -abhängige Sauerstoffreduktionsrate war vor und nach der Zugabe der terminalen Oxidase (16  $\mu\text{g}$ ) gleich groß. Sie betrug  $1,9 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1}$  (Abb. 52). Die spezifische  $\text{Na}_2\text{S}$ -abhängige Sauerstoffreduktionsaktivität der Membranfraktion (MF) von *A. ambivalens* bei  $50^\circ\text{C}$  und 1,25 mM  $\text{Na}_2\text{S}$  betrug  $69 \pm 7,3 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$  (Tab. 21, Abb. 53 A). Die Zugabe von 16  $\mu\text{g}$  terminaler Oxidase erhöhte die spezifische Aktivität um das 2,3-fache auf  $158 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$  (Tab. 21, Abb. 53 B).



**Abb. 52:** Na<sub>2</sub>S-abhängige Sauerstoffreduktion vor und nach der Zugabe von gereinigter terminaler Oxidase (aa<sub>3</sub>, 16 μg) von *A. ambivalens* bei 50°C und 1,25 mM Na<sub>2</sub>S.



**Abb. 53:** Na<sub>2</sub>S-abhängige Sauerstoffreduktion durch (A) Membranfraktion = MF (0,4 mg Gesamtprotein) alleine und (B) gereinigte terminale Oxidase von *A. ambivalens* und MF zusammen bei 50°C. KCN: Kaliumcyanid (250 μM), aa<sub>3</sub>: terminale Oxidase (16 μg).

Übereinstimmend damit erhöhte sich die spezifische Aktivität um das 3,4-fache auf 238 nmol O<sub>2</sub> (min mg Protein)<sup>-1</sup> bei der Zugabe von 24 μg terminale Oxidase (Tab. 21). Nach der Zugabe von Kaliumcyanid verringerte sich diese jeweils auf 30 nmol O<sub>2</sub> (min mg Protein)<sup>-1</sup> (Tab. 21, Abb. 53 B).

Diese Ergebnisse zeigten, dass ein Elektronentransport von Sulfid auf Sauerstoff nicht durch die terminale Oxidase alleine, sondern in Kombination mit einem oder mehreren Enzymen in der Membran katalysiert wird.

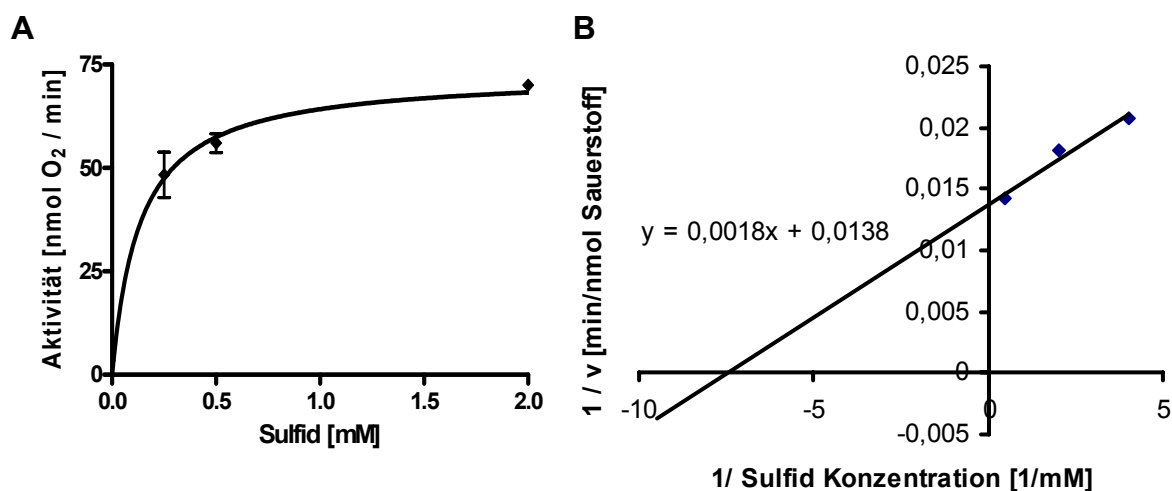
**Tab. 21:** Na<sub>2</sub>S-abhängige Sauerstoffreduktionsaktivität durch MF alleine und zusammen mit gereinigter terminaler Oxidase von *A. ambivalens* bei 50°C

Sulfid [mM]	aa <sub>3</sub> <sup>1</sup> [μg]	MF <sup>2</sup> [mg]	KCN [μM]	Aktivität [nmol O <sub>2</sub> /min]	Spezifische Aktivität [nmol O <sub>2</sub> /min mg]
1,25	0	0,4	0	27,6 ± 2,9	69 ± 7,3
1,25	16	0,4	0	63	158
			250	12	30
1,25	24	0,4	0	95	238
			250	12	30

<sup>1</sup>aa<sub>3</sub>: gereinigte terminale Oxidase; <sup>2</sup>MF: Membranfraktion

#### 4.3.3.3 Bestimmung der kinetischen Konstanten der Na<sub>2</sub>S-abhängigen Sauerstoffreduktion durch die MF

Für die Bestimmung von  $K_M$  und  $V_{max}$  wurden Reaktionsgeschwindigkeiten ( $v$ ) der Na<sub>2</sub>S-abhängigen Sauerstoffreduktion durch jeweils 1 mg Gesamtprotein der MF von *A. ambivalens* bei verschiedenen Na<sub>2</sub>S Konzentrationen (0,25 - 2 mM) ermittelt (Abb. 54 A). Die graphische Analyse durch ein Lineweaver-Burk-Diagramm ergab einen  $K_M$ -Wert von 0,13 mM Na<sub>2</sub>S und  $V_{max}$  von 72,5 nmol O<sub>2</sub> (min mg Protein)<sup>-1</sup> (Abb. 54 B).

**Abb. 54:** Enzymkinetik der Na<sub>2</sub>S-abhängigen Sauerstoffreduktion durch die MF.

**A)** Reaktionsgeschwindigkeiten bei 50°C in Abhängigkeit von der H<sub>2</sub>S-Konzentration.

**B)** Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung von  $K_M$  und  $V_{max}$ .

#### 4.3.3.4 Sauerstoffverbrauchsmessungen mit Sulfit und TT

Bei Aktivitätsmessungen des Sauerstoffverbrauchs der cytoplasmatischen und der Membranfraktion mit den schwefelhaltigen Substraten Sulfit und Tetrathionat, jeweils einzeln oder in Kombination zugefügt, wurden jeweils keine Aktivitäten gemessen.

## 5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die membrangebundene Thiosulfat-Chinon-Oxidoreduktase (TQO) aus aerob mit  $S^0$  oder Tetrathionat (TT) angezogenem *Acidianus ambivalens* ausführlich charakterisiert, als auch die enzymatischen Umsetzungen im aeroben Schwefelstoffwechsel von Sulfid bzw. TT untersucht, welches Produkte der SOR (Schwefel-Oxygenase/-Reduktase) bzw. der TQO sind. Auf den erhaltenen Resultaten aufbauend, wurde ein erweitertes Modell des Energiestoffwechsels von *A. ambivalens* erstellt, in dem nicht nur die TQO eine Schlüsselfunktion übernimmt und Elektronen in eine kurze Atmungskette einschleust, sondern auch Elektronen von Sulfid über eine SQO (Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase) in die Atmungskette eingeschleust werden, und TT durch eine TT-Hydrolase (TTH) umgesetzt wird.

### 5.1 Thiosulfat-Chinon-Oxidoreduktase

Thiosulfat (TS) entsteht im Cytoplasma von *A. ambivalens* als Primärprodukt der Schwefel-Oxygenase/-Reduktase oder in einer nicht-enzymatischen Reaktion und wird durch die TQO weiter umgesetzt (Kletzin *et al.*, 1989; Müller *et al.*, 2004). In Bakterien wird TS durch TS-Dehydrogenasen (TS-DHn) oder den Sox-Komplex oxidiert (Friedrich *et al.*, 2001; Nakamura *et al.* 2001).

#### 5.1.1 Lokalisierung und Reinigung der TQO

In früheren Versuchen wurde eine TS oxidierende Aktivität (TQO) in der Membran-, aber nicht in der löslichen (cytoplasmatischen) Fraktion von aerob mit  $S^0$  kultivierten *A. ambivalens* Zellen gemessen (Müller, 2003). Sie betrug mit Kaliumhexacyanoferrat(III) ( $K_3Fe(CN)_6$ ) als künstlichen Elektronenakzeptor  $1,5 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$ . Im Gegensatz dazu lagen die TS-DHn aus Thiobacilli in der löslichen oder der periplasmatischen Fraktion vor (Visser *et al.*, 1997a; Nakamura *et al.*, 2001).

Bei der in drei säulenchromatographischen Schritten durchgeführten Reinigung aus den solubilisierten Membranproteinen (Membransolubilisat) wurde die vollständig aktive terminale Chinol-Sauerstoff-Oxidoreduktase (Oxidase) im ersten Schritt von der TQO getrennt (Müller, 2003; Abb. 55). Im letzten Reinigungsschritt wurde die TQO nahezu rein um das 21-fache mit einer Ausbeute von 9,4% der Gesamtaktivität des Membransolubilisats (59 mg) und einer spezifischen Aktivität von  $49,9 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$  angereichert.

### 5.1.2 Untereinheiten der TQO

Eine SDS-PAGE Analyse des gereinigten Proteins zeigte, dass die TQO aus zwei verschiedenen Untereinheiten mit den apparenten molekularen Massen von 16 und 28 kDa bestand (Abb. 55, Müller, 2003; Müller *et al.*, 2004). Die 16 kDa Untereinheit wurde durch MALDI-TOF Analyse als DoxD und die 28 kDa Untereinheit durch N-terminale Sequenzierung und Sequenzvergleich als DoxA identifiziert (Kap. 4.1.9; Müller, 2003). DoxD und DoxA waren zuvor als Untereinheiten der terminalen Chinoloxidase charakterisiert worden (Purschke *et al.*, 1997). Daraus wurde geschlossen, dass die terminale Chinoloxidase einfacher aufgebaut ist, als es bisher angenommen wurde (Müller *et al.*, 2004; siehe auch 5.1.8).

Im Gegensatz zu DoxD wurde DoxA durch Alcianblau gefärbt, was auf eine signifikante Glycosylierung dieser Untereinheit hindeutete (4.1.11). Es wurde sowohl enzymatisch mit N- und O-Glycosidasen als auch chemisch mit TFMS (Triflourmethan-Sulfonsäure) versucht, die TQO zu deglycosylieren, um unter anderen die Struktur der Kohlenhydratketten und den relativen Gehalt der Glycosylierung aufzuklären (4.1.12). Enzymatisch konnte DoxA nicht deglycosyliert werden. Auch die terminale Chinoloxidase und ein S-Layer Protein jeweils aus *Acidianus ambivalens* konnten enzymatisch jeweils nicht deglycosyliert werden (Sousa, mündliche Mitteilung; Veith, 2006). Daraus wurde geschlossen, dass die glycosidischen Bindungen in den Proteinen von *A. ambivalens* besonders geschützt vorliegen oder sogar chemisch modifiziert sind, bzw. Glycosylreste nicht N- und O-glycosidisch an die Proteine gebunden sind. Nach der chemischen Deglycosylierung der TQO mit TFMS war nur noch eine nicht-glycosylierte Proteinbande bei 16 kDa vorhanden (4.1.12). Weil deglycosyliertes DoxA eine ähnliche Masse (18,7 kDa) wie DoxD aufweist, könnte es im SDS-Polyacrylamidgel zusammen mit DoxD auf der gleichen Höhe gelaufen sein. Allerdings waren bei den Kontrollen mit BSA (Rinderserumalbumin) und VSG (variables Oberflächenprotein von Trypanosomen) nach der Inkubation mit TFMS die Proteine nicht mehr nachweisbar. Daraus wurde geschlossen, dass BSA, VSG und DoxA jeweils durch TFMS hydrolysiert und vollständig abgebaut wurde (4.1.12). Durch diese Versuche ist es nicht gelungen, einen Hinweis auf die chemische Bindung der Glycosylreste zu erhalten.

Die apparenten molekularen Massen von DoxD und DoxA im SDS-Gel unterschieden sich jeweils erheblich von den aus den Aminosäuresequenzen berechneten molekularen Massen (DoxD: 20,4 kDa; DoxA: 18,7 kDa; 4.1.9; Abb. 55).

DoxD und DoxA sind sehr hydrophobe Proteine (37,5% für DoxD und 32% für DoxA), was dieses auch schon zuvor beobachtete ungewöhnliche Laufverhalten von DoxD und DoxA (Purschke *et al.*; 1997) erklären kann (Schägger, 2006). Zusätzlich resultierte die hohe apparente molekulare Masse von DoxA höchstwahrscheinlich aus der bisher un spezifizierten Glycosylierung (4.1.11). DoxD war nicht glycosyliert und lief im Gel bei einer geringeren Masse als berechnet (4.1.9). Eine extensive proteolytische Prozessierung konnte allerdings ausgeschlossen werden, da die MALDI-TOF Fragmente die Aminosäurepositionen 5 bis 179 aus insgesamt 184 mit einschlossen (4.1.9). Daher konnte die Abspaltung einer Signalsequenz während des Einbauprozesses des Proteins in die Membran die geringere apparente Masse nicht erklären.

Die durch Gelfiltrationschromatographie bestimmte apparente molekulare Masse der nativen TQO war 102 kDa (Müller *et al.*, 2004). Auf der Basis der molekularen Massen der Untereinheiten und des nativen Enzyms wurde für die Quartärstruktur des TQO Holoenzym ein  $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer abgeleitet. Die berechnete Masse des Holoenzym beträgt bei der Verwendung der experimentell ermittelten apparenten molekularen Masse der DoxA Untereinheit und der aus der Sequenz berechneten Masse für DoxD 96 kDa (Müller *et al.*, 2004). Diese berechnete Masse war in guter Übereinstimmung mit der experimentell bestimmten Masse des Holoenzym.

### 5.1.3 Cofaktoren der TQO

Das Absorptions- und das Fluoreszenzemissionsspektrum der durch organische Extraktion erhaltenen Lösung der TQO Cofaktoren waren nahezu identisch zu den jeweiligen Spektren von isoliertem Caldariella Chinon (CQ) aus *A. ambivalens* (Schäfer *et al.*, 1990; Müller, 2003; 4.1.5; Müller *et al.*, 2004). Massenspektren der Chinonfraktionen, die aus der gereinigten TQO, der Membranfraktion und den TQO-aktiven Fraktionen der Reinigungszwischenschritte isoliert wurden, zeigten, dass die Caldariella Chinone CQ-6(12H) und CQ-6(10H), Menachinon und das Sulfolobus Chinon SQ-6(12H) jeweils darin enthalten waren (4.1.6; Thurl *et al.*, 1986). Daraus wurde geschlossen, dass die gleiche Mischung von Chinonen, die in der Membran von aerob gewachsenen Zellen vorhanden ist, auch in gereinigter TQO gefunden wurde (Müller *et al.*, 2004). Allerdings lösten sich die Chinon-Cofaktoren während der Reinigung von der TQO, worauf die Verhältnisse von 4 mol Chinon pro mol TQO Holoenzym nach Hydroxyapatit- und von 2 mol Chinon pro mol TQO nach

Gelfiltrationschromatographie hindeuteten (4.1.7). Daraus wurde geschlossen, dass die Chinoncofaktoren wahrscheinlich nicht-kovalent an die TQO gebunden sind. Außer Chinon wies die TQO keine zusätzliche redox-aktiven Cofaktoren auf, da Metalle nicht in signifikanten Mengen nachgewiesen wurden (4.1.8).

#### 5.1.4 Aktivität der TQO

Die TQO reduzierte jeweils die nicht-nativen Elektronenakzeptoren  $K_3Fe(CN)_6$  und Decylubichinon (DQ) (Müller, 2003; 4.1.1; Müller *et al.*, 2004). Die spezifische Aktivität mit DQ betrug  $2,4 \pm 0,08$  U (mg Protein)<sup>-1</sup> (4.1.1). Die Geschwindigkeit der DQ-Reduktion erhöhte sich, wenn eine größere Menge der TQO eingesetzt wurde (4.1.1). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die DQ-Reduktion von der TQO abhängig war. Daraus, dass die TQO DQ reduzierte und *Caldariella* Chinon (CQ) und *Sulfolobus* Chinon (SQ) enthielt, wurde geschlossen, dass die nativen Chinone CQ und/oder SQ (Thurl *et al.*, 1986; Trincone *et al.*, 1989) die physiologischen Elektronenakzeptoren der TQO sind (Müller *et al.*, 2004; siehe auch 5.1.3). Im Gegensatz dazu reduzierte die TQO Cytochrom c nicht (Müller *et al.*, 2004; 4.1.1), was damit übereinstimmte, dass in der Membran von *A. ambivalens* keine C-Typ Cytochrome gefunden wurden (Anemüller *et al.*, 1994). Aufgrund des Elektronenakzeptors Chinon repräsentierte die TQO das erste Enzym einer neuen EC Klasse mit der Nummer 1.8.5.2 (Müller *et al.*, 2004; siehe auch 5.1.9).

Die mit DQ als Elektronenakzeptor gemessene Aktivität hing von der Reihenfolge der Zugaben der Substrate (TS und DQ) und der TQO ab (4.1.1). Aktivität wurde nur beobachtet, wenn DQ oder Enzym als letztes, aber nicht wenn DQ vor TS zur TQO hinzugegeben wurde (4.1.1). Zusätzlich wurde DQ nach der beendeten Reaktion durch die Zugabe geringer Mengen von Natriumborhydrid weiter reduziert (4.1.1). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass Chinon fest an die aus der Membran solubilisierte TQO bindet, und dadurch eine normale Substratumsatzrate durch Sättigung der Bindestelle an der TQO verhindert wurde (Müller *et al.*, 2004).

Das Produkt der TQO war TT und wurde aus zwei Molekülen TS gebildet (Müller *et al.*, 2003). Dies bedeutete, dass TT als Zwischenprodukt im aeroben Schwefelstoffwechsel von *A. ambivalens* freigesetzt wird, der daher als „S<sub>4</sub>-Zwischenprodukt“ Oxidationsreaktionsweg bezeichnet werden könnte, wie auch in den Bakterien *Acidithiobacillus* und *Acidiphilum* vorkommend (Kelly *et al.*, 1997; Brüser *et al.*, 2000; Friedrich *et al.*, 2001).

Die apparenten  $K_M$ -Werte von 3,4 mM und 5,87  $\mu\text{M}$  wurden für die Elektronenakzeptoren Eisencyanid bzw. DQ bestimmt, was die Schlussfolgerung unterstützte, dass Chinon der native Elektronenakzeptor der TQO ist (4.1.3; Müller *et al.*, 2004). Für TS wurden ein apparenter  $K_M$ -Wert von 2,6 mM, eine apparente maximale Geschwindigkeit ( $V_{\text{max}}$ ) von 78 U (mg Protein)<sup>-1</sup> und bei einer Konzentration von 10 mM eine Umsatzrate ( $k_{\text{cat}}$ ) von 167 s<sup>-1</sup> ermittelt, woraus sich eine Spezifitätskonstante von 64000 s<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> ergab (Müller, 2003). Obwohl diese Werte ( $K_M$  und  $k_{\text{cat}}$ ) für TS nicht sehr vorteilhaft waren, lagen sie dennoch in der Größenordnung, die für die TS-oxidierenden TS-DHn aus *Thiobacillus ferrooxidans* und *T. neapolitanus* beschrieben wurden (zusammengefasst in Visser *et al.*, 1997a; siehe auch Nakamura *et al.*, 2001). Aufgrund beträchtlicher Unterschiede in  $V_{\text{max}}$  wurden die TS-DHn in zwei Klassen eingeteilt – eine langsame [100 – 300 U (mg Protein)<sup>-1</sup>] und eine andere schnelle [1200 – 4500 U (mg Protein)<sup>-1</sup>] (Visser *et al.*, 1997a). Die TQO von *A. ambivalens* scheint zur langsamen Klasse zu gehören (Müller *et al.*, 2004).

In Übereinstimmung damit, dass in Extrakten (cytoplasmatische und Membranfraktion) von anaerob mit S<sup>0</sup> kultivierten Zellen keine TQO-Aktivität gemessen wurde, konnte auch keine *doxDA*-mRNA bei anaeroben Wachstum nachgewiesen werden (4.1.15).

### 5.1.5 Inhibition der TQO

Das Reaktionsprodukt TT inhibierte die TQO bis zu einer Konzentration von 1 mM nicht und in höheren Konzentrationen nur geringfügig (Müller, 2003; Müller *et al.*, 2004). Sulfat zeigte auch keinen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität der TQO. Das thiol-modifizierende Reagens N-Ethylmaleimid (NEM), Zinkionen und das Reduktionsmittel Titancitrat zeigten nur eine mäßige Inhibition der TQO (Müller, 2003; Müller *et al.*, 2004). Aus der relativen Unsensitivität der TQO gegenüber der Inhibition durch NEM ergab sich allerdings, dass wahrscheinlich kein Cysteinrest an der katalytischen Reaktion beteiligt ist, obwohl der einzige Cysteinrest 150 in DoxD konserviert war und auch deshalb als eine putative TS Bindestelle galt (Müller, 2003; 4.1.13; Müller *et al.*, 2004).

Im Gegensatz dazu erfolgte eine starke Inhibition der TQO-Aktivität durch Sulfid mit einem apparenten  $K_i$ -Wert von 5  $\mu\text{M}$  (Müller, 2003; Müller *et al.*, 2004). Metabisulfit, Dithionit und Triton X-100 wirkten ebenfalls als starke Inhibitoren der TQO. Dass die TQO durch Sulfid und andere oxidierten Zwischenprodukte des Schwefels inhibiert



wurde, war insofern bemerkenswert, als dass Sulfid eines der Primärprodukte der Schwefeloxidation in *A. ambivalens* darstellt. Die Inhibition durch Sulfid wurde auch für einige TS-DHn beschrieben (Visser *et al.*, 1997a). Dennoch wurde die Inhibition eher auf eine feste Bindung des Sulfids an die TS-Bindestelle aufgrund der ähnlichen Größe und Oberflächenladung der Moleküle als auf das niedrige Reduktionspotential von Sulfid ( $E_0' = -527$  mV; Thauer *et al.*, 1977) oder Dithionit zurückgeführt (Müller *et al.*, 2004). Diese Interpretation wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass das starke Reduktionsmittel Titancitrat sowohl in der oxidierten als auch in der reduzierten Form nur mäßig inhibierte (Müller, 2003; Müller *et al.*, 2004).

### 5.1.6 pH- und Temperaturabhängigkeit der TQO

Der optimale pH-Wert der TQO lag bei 80°C im Bereich von 4,8 bis 5 und war somit den optimalen pH-Werten der meisten TS-DHn ähnlich (Müller, 2003; Müller *et al.*, 2004; Visser *et al.*, 1997a). Er lag also zwischen dem optimalen pH-Wert des Wachstumsmediums (2,5) und dem des Cytoplasmas (6,5; Moll & Schäfer, 1988). Die geringe chemische Stabilität von TS bei hohen Temperaturen und niedrigen pH-Werten, welches unter diesen Bedingungen tendiert, in Sulfid, Sulfat und Schwefel zu disproportionieren (Roy & Trudinger, 1970), sprach allerdings dafür, dass die TQO-Reaktion im Cytoplasma stattfindet.

Steigende Enzymaktivität war im Bereich von 20 bis 92°C zu beobachten, übereinstimmend damit, dass *A. ambivalens* bei 80°C optimal wächst (4.1.2; Müller *et al.*, 2004; Zillig *et al.*, 1986).

### 5.1.7 Sekundärstrukturanalyse der TQO

Topologievorhersagen ergaben, dass DoxA eine und DoxD vier transmembrane Helices enthält (4.1.13). Die Ergebnisse aus der Sekundärstrukturvorhersage unterschieden sich allerdings von den erhaltenen Werten bei der CD-Spektroskopie vom aktiven TQO-Holoenzym. Aus den kombinierten Strukturvorhersagen für die getrennt voneinander berechneten löslichen und transmembranen Teile der TQO ergab sich ein um 14,8 Prozentpunkte höherer Gehalt an  $\beta$ -Faltblättern (26,4%) und ein um 13,6 Prozentpunkte niedrigerer Gehalt an  $\alpha$ -Helices (32,4%) (4.1.10, Abb. 13; 4.1.13). Im Gegensatz dazu ergab die Sekundärstrukturvorhersage für DoxD mit einem Gehalt von 15,8% für die  $\beta$ -Faltblätter und von 39,7% für die helicalen Bereiche eine gute Übereinstimmung mit der Sekundärstrukturanalyse durch CD-

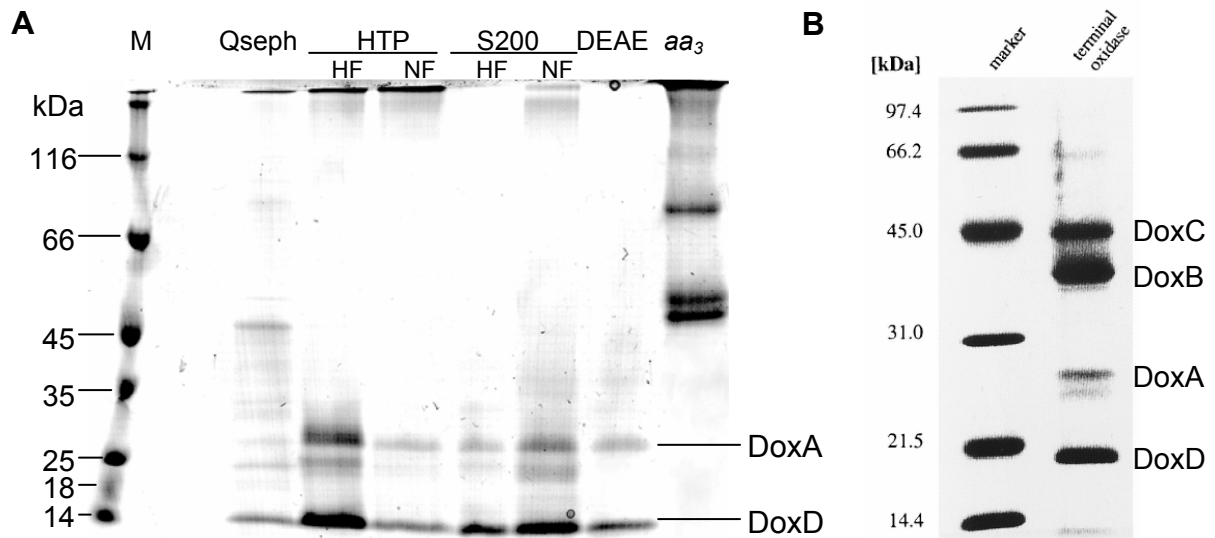
Spektroskopie einer Präparation von DoxD, in der nur DoxD in einer inaktiven Form, aber nicht DoxA enthalten war (4.1.10, Abb. 13; 4.1.13).

Die Topologievorhersage für DoxA ergab zusätzlich, dass die transmembrane Helix am N-Terminus und der größte Bereich außerhalb der Membran auf der Außenseite liegt, in dem die konservierten Asp-Reste 252 und 303 – mögliche N-Glycosylierungsstellen – enthalten sind (4.1.13). Die Lokalisierung auf der Außenseite der Membran stimmte damit überein, dass die Glycosylierung vor allem dem Schutz vor äußeren Einflüssen wie ein niedriger pH-Wert des Mediums und möglicherweise auch Hitze dient (Langsford *et al.*, 1987; Olsen & Thomsen, 1991).

### 5.1.8 Revision des Modells der Chinol-Sauerstoff-Oxidoreduktase

Die *doxD* und *doxA* Gene bilden ein bicistronisches Operon im Genom von *A. ambivalens*, welches in einer Kopienzahl von eins oder zwei vorliegt und physikalisch vom *doxBCEF* Operon getrennt ist, das die katalytischen und andere Untereinheiten der terminalen Chinol-Sauerstoff-Oxidoreduktase (Oxidase) codiert (4.1.14; Purschke *et al.*, 1997). Untereinheiten mit den apparenten molekularen Massen von 56 (DoxB) und 61 kDa (DoxC), aber nicht mit Massen von 20 und 28 kDa, traten bei der hier durchgeführten Reinigung der terminalen Oxidase in Erscheinung (eine 95 kDa Bande war wahrscheinlich eine Kontamination; Abb. 55, Müller *et al.*, 2004; Müller, 2003). Diese Ergebnisse unterstützten die Schlussfolgerung, dass beide Enzyme, die TQO und die terminale Oxidase, getrennte Einheiten bilden, und dass die zuvor beobachtete Co-Reinigung aus einer unterschiedlichen Prozedur resultierte (Anemüller *et al.*, 1994; Purschke *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 2004). Folglich musste das Modell der Funktionsweise der Untereinheiten der terminalen Oxidase revidiert werden (Müller *et al.*, 2004). Die Häm und Cu<sub>B</sub> enthaltende DoxB Untereinheit ist die einzige mit geringer, aber signifikanter Ähnlichkeit zu andern terminalen Oxidasen. Keine der Sequenzen der anderen als mitwirkend vermuteten Untereinheiten (DoxA, -C, -D, -E und -F) ergaben einen aussagekräftigen Vergleich mit Untereinheiten von bekannten Oxidasen (Müller *et al.*, 2004). DoxA wurde als Pseudountereinheit II und DoxC als Pseudountereinheit III vermutet (Purschke *et al.*, 1997). Mit diesen hier präsentierten Ergebnissen war es offensichtlich, dass DoxD und DoxA nicht zur Chinoloxidase gehören, welche also vorwiegend aus den Untereinheiten DoxB und DoxC besteht. DoxE und DoxF wurden bislang biochemisch nicht nachgewiesen (Purschke *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 2004). Die hier gefundene Reduzierung der

Untereinheiten der Chinoloxidase führte zu einem noch einfacheren Aufbau als bei bakteriellen Oxidasen (Musser *et al.*, 1993; Trumpower & Gennis, 1994; Castresana *et al.*, 1994; Garcia-Horsman *et al.*, 1994), obwohl die genaue Funktion der Untereinheit DoxC noch ungeklärt ist.



**Abb. 55: A)** Coomassie gefärbtes, 10%iges SDS-Polyacrylamidgel mit Reinigungsfractionen der TQO. M: Protein Marker (# SM0431), Qseph: aktive Fraktion nach Q-Sepharose-Chromatographie (Auftragsgipfel), HTP HF bzw. NF: aktive Haupt- bzw. Nebenfraktion nach Hydroxyapatit-Chromatographie, S200 HF bzw. NF: aktive Haupt- bzw. Nebenfraktion nach Gelfiltrations-Chromatographie, DEAE: aktive Fraktion nach DEAE-Sepharose-Chromatographie (Auftragsgipfel), aa<sub>3</sub>: gereinigte und aktive terminale Chinol:Sauerstoff-Oxidoreduktase (Cytochrom aa<sub>3</sub>). DoxA und DoxD: Untereinheiten der TQO (Müller, 2003; Müller *et al.*, 2004).

**B)** 15%iges SDS-Polyacrylamidgel mit der zuvor gereinigten terminalen Oxidase (aus Purschke *et al.*, 1997).

### 5.1.9 Eine neue Enzymfamilie von membrangebundenen Oxidoreduktasen

Die hergeleiteten Aminosäuresequenzen von drei in öffentlichen Datenbanken gefundenen *doxD/doxA* Genpaaren aus drei verschiedenen Organismen wiesen jeweils eine hohe Ähnlichkeit zu DoxD und DoxA von *A. ambivalens* auf (von *Metallosphaera sedula*, *Sulfolobus solfataricus* und *S. tokodaii*; 4.1.13; Müller *et al.*, 2004). Aus dem Grad der Ähnlichkeiten konnte geschlossen werden, dass diese ebenso TQO Proteine codieren (Müller *et al.*, 2004). Die zweiten homologen als *doxD2A2* bezeichneten Genpaare im Genom von *A. ambivalens* und *S. solfataricus* wiesen eine geringere, aber signifikante Ähnlichkeit in den Aminosäuresequenzen zu DoxD und DoxA auf (4.1.13). Es ist nicht bekannt, ob diese Gene Proteine mit TQO-Aktivität oder mit einer anderen Funktion codieren.

Interessanterweise wurden zwei fusionierte *doxDA*-Gene in der Genomsequenz des schwefel- und eisenoxidierenden acidophilen Bakteriums *Acidithiobacillus ferrooxidans* gefunden (4.1.13; Müller *et al.*, 2004). Die Genduplikation dieses *doxDA*-Gens ließ eine wichtige Rolle im Metabolismus des Bakteriums vermuten. Allerdings muss erst noch untersucht werden, ob die aus den codierenden Genen synthetisierten Proteine an der TS-Oxidation beteiligt sind oder nicht (Müller *et al.*, 2004). Eine TS-oxidierende Enzymaktivität in *Acidithiobacillus ferrooxidans* wurde bereits beschrieben (Silver und Lundgren, 1968; Janiczek *et al.*, 2007). Obwohl die Zusammensetzung des TS-oxidierenden Enzyms aus den Untereinheiten dargestellt wurde, wurde nicht geklärt, ob es Chinon enthielt. Die beschriebene Reinigungsprozedur gab keinen Hinweis darauf, ob das Enzym membranständig oder löslich war (Janiczek *et al.*, 2007). Weil die beobachtete Aktivität nicht eindeutig auf die in der Genomsequenz gefundenen fusionierten *doxDA*-Gene zurückzuführen ist, ist es offen, ob es sich bei diesem Enzym um eine TQO oder eine TS-DH handelt.

Bei der Suche in den *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *Sulfolobus* spp. Genomsequenzen nach den Sox-Komplex codierenden *soxABCDEF*- und *soxXYZ*-Genen von *Paracoccus pantotrophus* (Friedrich *et al.*, 2000; 2001) wurden keine Homologe außer einer Sequenz mit geringer Ähnlichkeit zu *soxF* gefunden (Müller *et al.*, 2004). Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass *Acidithiobacillus ferrooxidans* das erste gut untersuchte mesophile Bakterium ist, welches eine TQO und nicht den Sox oder TOMES Komplex zur TS-Oxidation verwendet, den viele andere neutrophile, Schwefel- und TS-oxidierende Bakterien synthetisieren. Außerdem wurde festgestellt, dass die *sox*-Gene nicht in den Sulfolobales vorkommen (Friedrich *et al.*, 2001).

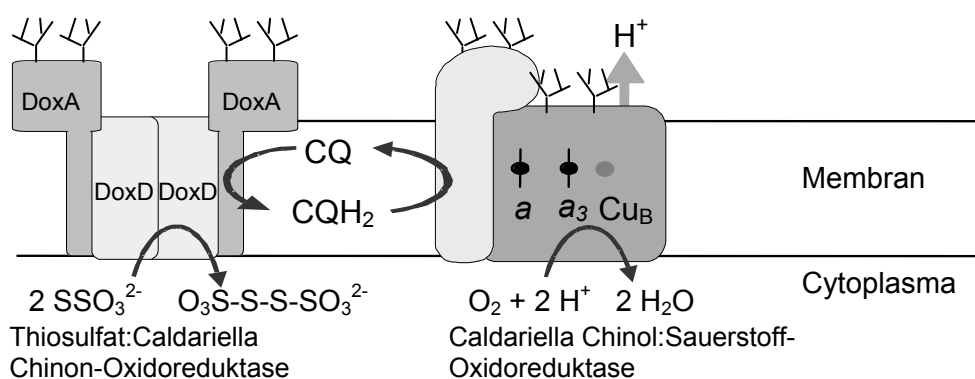
Ein Vergleich der TQO Aminosäuresequenz mit Sequenzen von TS-DHn war nicht möglich, weil keine Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen in der Literatur und den Sequenzdatenbanken vorhanden waren. Deren Größe und Zusammensetzung der Untereinheiten ist in manchen Fällen ähnlich, in anderen jedoch nicht. Im Gegensatz zur TQO reduzierten die TS-DHn Cytochrom *c* oder nicht-häm Eisen (4.1.1; Meulenberg *et al.*, 1993; Visser *et al.*, 1997a; Nakamura *et al.*, 2001; Hensen *et al.*, 2006; Lyric & Suzuki, 1970). Außerdem wurden sie alle aus der löslichen (cytoplasmatischen) und/oder der periplasmatischen Fraktion gereinigt, was zur Schlussfolgerung führte, dass diese einer anderen Enzymfamilie angehören, und die hier beschriebene

TQO einen neuen Typ darstellt (Visser *et al.*, 1997a; Nakamura *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2004).

### 5.1.10 Kopplung der Oxidation von Schwefelverbindungen mit der Sauerstoffreduktion

Die Beobachtungen, dass gereinigte TQO DQ reduzierte, und dass CQ und SQ am Protein gebunden (nicht-kovalent) vorlagen, stärkten die Vermutung, dass die letztgenannten Elektronen-Protonen-Transporter die physiologischen Cofaktoren des Enzyms sind. Zusätzlich wies die zuvor beschriebene Co-Reinigung der TQO und der terminalen Chinol:Sauerstoff-Oxidoreduktase darauf hin, dass diese beiden Enzyme *in vivo* dicht beieinander agieren und eventuell einen Superkomplex bilden (Müller *et al.*, 2004). Die Standardredoxpotentiale der verschiedenen Verbindungen (TS/TT  $E_0' = + 25$  mV; Eisencyanid oxidiert/reduziert = + 356 mV; DQ oxidiert/reduziert = + 70 mV (Rich, 1984); CQ oxidiert/reduziert = + 103 mV (Anemüller & Schäfer, 1990)) zeigten, dass diese Reaktionen thermodynamisch möglich sind.

Um diese Hypothese zu testen, wurde überprüft, ob ein TS angetriebener Sauerstoffverbrauch durch die intakte Membran stattfindet (4.1.4; Müller *et al.*, 2004). Ein TS-abhängiger und ebenso Cyanid-sensitiver Sauerstoffverbrauch durch die Membran konnte tatsächlich gemessen werden (4.1.4). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde gefolgert, dass CQ Elektronen zwischen der TQO und der terminalen Chinol-Oxidase transportiert (Abb. 56), da diese die einzige vorhandene Sauerstoffreduktase in der Atmungskette von *A. ambivalens* ist (Anemüller *et al.*, 1994, Giuffre *et al.*, 1997; Das *et al.*, 1999). Diese Reaktion verstärkt also den transmembranen Protonengradienten und folglich die ATP Produktion.



**Abb. 56:** Schematische Darstellung der Interaktion zwischen TQO und terminaler Sauerstoffreduktase. DoxA und die Untereinheiten der terminalen Oxidase sind glycosyliert, was auf der äußeren Seite symbolisch dargestellt ist. CQ: Caldariella Chinon. a: Häm a; Cu: Kupferatom.

## 5.2 Tetrathionat-Hydrolase

Tetrathionat (TT) ist das Produkt der TQO und kann wie Schwefel ( $S^0$ ) als alleiniges Substrat von *A. ambivalens* zum Wachstum unter aeroben Bedingungen genutzt werden. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, wie TT weiter oxidiert wird. In Bakterien wird TT zumeist von Hydrolasen (TTH) umgesetzt. Allerdings wurde der Reaktionsmechanismus bislang noch nicht aufgeklärt. TTH-Aktivität wurde in verschiedenen Acidithiobacilli gefunden und die Enzyme zum Teil vollständig gereinigt (Sugio *et al.*, 1996; Kanao *et al.*, 2007). Verschiedene Reaktionsabläufe wurden vorgeschlagen und unterschiedliche Produkte der TTHn gefunden (Steudel *et al.*, 1987; Tano *et al.*, 1996). Bei jeder TTH-Reaktion wurde TS als Produkt gefunden. Zusätzlich wurden  $S^0$ , Sulfat und/oder Pentathionat als Produkte der TTH bestimmt (Wentzien *et al.*, 1994; De Jong *et al.*, 1997a, b; Sugio *et al.*, 1996; Bugaytsova & Lindström, 2004).

### 5.2.1 Reinigung der TTH

In aerob mit TT kultivierten Zellen wurde eine um das 61-fache größere Tetrathionat-Hydrolase (TTH)-Gesamtaktivität als in mit  $S^0$  kultivierten Zellen bestimmt. 99,8% der TTH waren in der löslichen Fraktion vorhanden (Tab. 12, Kap. 4.2.5.1.2), was darauf hindeutete, dass es sich bei der TTH um ein lösliches Protein handelt. Es wurden mehrere Versuche unternommen, die TTH zu reinigen, jeweils ohne eine endgültige Reinigung zu erzielen. Von allen Reinigungsversuchen wurden hier zwei exemplarisch dargestellt. Im ersten Versuch wurde eine Fraktion mit vielen Proteinbanden und einer Hauptbande bei 18 kDa erhalten (4.2.1.1, Abb. 25). Eine N-terminale Sequenzierung dieser Bande und ein Sequenzvergleich ergaben, dass es sich um eine Pyrophosphatase (PPase) handelte (4.2.1.1). Aktivitätstests zeigten, dass die Proteinfraction Pyrophosphat hydrolysierte (4.2.2). Aufgrund der strukturellen und chemischen Ähnlichkeiten von Pyrophosphat und Tetrathionat könnte vermutet werden, dass die PPase auch TT hydrolysieren und somit TTH-Aktivität aufweisen könnte. Da sie jedoch im Gegensatz zur TTH bei pH 7,5 aktiv war (3.16.8; 4.2.5.2), kann eine TTH-Aktivität der PPase wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

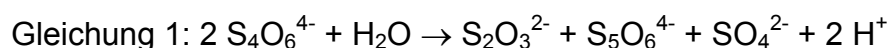
Im zweiten Reinigungsversuch wurden Proteine mit den apparenten Massen von 41 und 126 kDa angereichert (4.2.1.2). Die N-terminalen Sequenzierungen dieser Proteine führten zu keinen Ergebnissen. Weil die homodimeren TTHs aus

*Acidithiobacillus acidophilum* (DSM 700), *A. caldus* KU, *A. thiooxidans* (ON107) und *A. ferrooxidans* (ATCC 19859) Untereinheiten mit Massen im Bereich von 48 bis 58 kDa aufwiesen (De Jong *et al.*, 1997b; Bugaytsova & Lindström, 2004; Tano *et al.*, 1996), könnte es sich bei dem angereicherten 41 kDa Protein um die Untereinheit der TTH handeln.

Obwohl die Reinigungsfaktoren der beiden Reinigungen bei 65,9 bzw. 89 lagen, war die TTH jeweils noch nicht rein und enthielt viele kontaminierende Proteine. Die Ausbeuten betrugen 16% und 10% (4.2.1.1; 4.2.1.2). Es traten also jeweils starke Verluste der Aktivität auf, was auch auf den Verlust eines Cofaktors (PQQ) zurückgeführt werden könnte, worauf Absorptionsspektren der Reinigungsfractionen hindeuteten (4.2.1.2; 4.2.3; siehe auch 5.2.3). Daraus, dass keine TTH-Aktivität im Filtrat gemessen wurde, sondern nur im Konzentrat nach einer Ultrafiltration mit Konzentratoren mit einem Ausschlussvolumen von 30 kDa, wurde geschlossen, dass die Masse des TTH Holoenzym größer als 30 kDa ist (4.2.5.1.2). Obwohl die TTH extrem resistent gegenüber der Spaltung durch Protease war (4.2.5.1.2), handelt es sich um ein Protein, da durch SDS eine vollständige Inaktivierung erfolgte (4.2.5.1.3, Tab. 13). Außerdem wurde durch Aktivitätstests mit isolierter RNA aus *A. ambivalens*, Inkubation von TTH-Extrakten mit DNase oder RNase und die genannte Filtration ausgeschlossen, dass die Aktivität auf DNA-, RNA-Moleküle oder niedermolekulare Substanzen zurückzuführen war (4.2.5.1.2).

### 5.2.2 Mögliche Reaktion, Aktivität und Lokalisation der TTH

TTH-Aktivität wurde bei 80°C gemessen, und eine Bestimmung der Tetrathionat (TT) und Thiosulfat (TS) Konzentrationen erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten der Reaktion durch Cyanolyse. Hierbei wurde festgestellt, dass während der TTH Reaktion TT verbraucht und TS gebildet wurde. Zusätzlich ergaben die Substrat- und Produktkonzentrationen von TT und TS eine Stöchiometrie für die Reaktion, die mit der möglichen Reaktionsgleichung für die TTH aus *Acidithiobacillus caldus* übereinstimmte (Gleichung 1; Bugaytsova & Lindström, 2004).



Aus 2 mol TT wird jeweils 1 mol der Produkte TS, Pentathionat und eventuell Sulfat gebildet. Hierbei könnte als Primärprodukt ein instabiles Disulfanmonosulfonat ( $\text{S}_3\text{O}_3^{2-}$ ) gebildet werden (Steudel *et al.*, 1987), welches nicht-enzymatisch mit TT zu den Produkten TS und Pentathionat reagiert (Wentzien *et al.*, 1994). Diese

Reaktionen könnten auch für die TTH aus *A. ambivalens* zutreffen. Der Nachweis von Pentathionat war hier nicht möglich, weil die technischen Voraussetzungen hierfür nicht gegeben waren. Im Gegensatz dazu wurde aus Versuchen mit gereinigten TTHn aus *A. ferrooxidans* und *A. acidophilum* geschlossen, dass bei der Hydrolyse von TT Schwefel, Sulfat und TS in äquimolaren Mengen gebildet werden (De Jong *et al.*, 1997a, b; Kanao *et al.*, 2007). Andere gereinigte TTHn aus *A. thiooxidans* und *A. ferrooxidans* *Funis 2-1* disproportionieren TT zu TS und Sulfat (Tano *et al.*, 1996; Sugio *et al.*, 1996).

Die Bestimmungen der kinetischen Konstanten bei 80°C ergaben einen  $K_M$ -Wert von 1,3 mM TT und  $V_{max}$  von 55 mU (5,5 U/mg) (4.2.4.3). Die höchste gemessene spezifische TTH-Aktivität lag bei 3,9 U (mg Protein)<sup>-1</sup> und war vergleichbar mit den Aktivitäten der TTHs aus *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. caldus* KU und *A. thiooxidans* (ON107), welche im Bereich von 1,4 bis 4,8 U (mg Protein)<sup>-1</sup> lagen (De Jong *et al.*, 1997b; Bugaytsova & Lindström, 2004; Tano *et al.*, 1996). Die TTH aus *A. caldus* wurde durch zweiwertige Ionen wie Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> und Ammoniumsulfat aktiviert, wobei sich die Aktivität bis um das 13-fache erhöhte, und durch Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> leicht inhibiert (Bugaytsova & Lindström, 2004). Im Vergleich dazu änderte sich die Aktivität der TTH aus *Acidianus ambivalens* durch das Vorhandensein von Zn<sup>2+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> oder Mg<sup>2+</sup> maximal um das 1,2-fache (4.2.5.1.3). Angesichts einer optimalen Wachstumstemperatur bei 80°C von *A. ambivalens* lag der optimale Temperaturbereich der TTH erwartungsgemäß hoch, nämlich bei über 90°C und entsprach damit der Temperaturabhängigkeit der TQO und der Typ II NADH-Dehydrogenase aus *A. ambivalens* (Zillig *et al.*, 1986; 4.2.5.2; Müller *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2001a). Im Gegensatz zu den pH-Optima im Bereich von 2,5 bis 4,0 der TTHn aus *Acidithiobacillus acidophilum* (DSM 700), *A. caldus* KU und *A. ferrooxidans* (De Jong *et al.*, 1997a, b; Bugaytsova & Lindström, 2004; Kanao *et al.*, 2007) lag das pH-Optimum der löslichen TTH aus *A. ambivalens* bei 1, was darauf hindeutete, dass die TTH auf der äußeren Seite der Membran aktiv ist (4.2.5.2), weil der pH-Wert im Cytoplasma bei 6,5 (Moll & Schäfer, 1988) und der „äußere“ pH-Wert also im Medium in der spätexponentiellen bzw. stationären Wachstumsphase um pH 1 liegt. Die Hypothese, dass es sich bei der TTH um ein extrazelluläres, pseudoperiplasmatisches Protein handelt, wurde durch die Ergebnisse der Solubilisierungsversuche der TTH durch Spheroplastierung gestützt. Hierbei war die spezifische TTH-Aktivität nach der Solubilisierung mit 10 mM EDTA um das 27-fache



höher als nach einem kompletten Zellaufschluss. Zudem unterschieden sich die Absorptionsspektren der beiden zellfreien Extrakte voneinander (4.2.3). Außerdem liegt TT bei der Kultivierung von *A. ambivalens* mit TT als Substrat im Medium, also außerhalb der Zellen, vor. Vorhandene Signalsequenzen in möglichen *tth*-Genen des Genoms von *A. ambivalens* (siehe unten) deuteten ebenso darauf hin, dass die TTH ins Pseudoperiplasma geschleust wird. Übereinstimmend damit liegen die TTHn aus *Acidithiobacillus acidophilum* (DSM 700), *A. caldus* KU, *A. thiooxidans* (ON107) und *A. ferrooxidans* (ATCC 19859) im Periplasma vor (De Jong *et al.*, 1997 b; Bugaytsova & Lindström, 2004; Tano *et al.*, 1996).

### 5.2.3 Möglicher Cofaktor der TTH

In *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *A. caldus* wurden jeweils *tth*-Gene (*tth<sub>af</sub>* bzw. *tetH*) identifiziert, deren Produkte jeweils eine vorhergesagte Pyrrolochinolin-Chinon (PQQ) Bindedomäne aufwiesen (Kanao *et al.*, 2007; Bugaytsova & Lindström, 2004; Rzhepishevskaya *et al.*, 2007). Experimentell wurde allerdings gezeigt, dass PQQ in Chinonextrakten von TetH wahrscheinlich nicht vorhanden war (Rzhepishevskaya *et al.*, 2007). Die bioinformatische Analyse des Genoms von *Acidianus ambivalens* ergab, dass zwei verschiedene *tth*-Gene vorhanden waren, deren Produkte jeweils eine Signalpeptidsequenz und eine PQQ Bindedomäne aufwiesen. Daher wurde die Wirkung von PQQ auf die Aktivität der TTH von *A. ambivalens* untersucht. Eine mit PQQ inkubierte TTH-Proteinfraktion zeigte eine um das dreifache höhere Aktivität als ohne PQQ. Daraus wurde geschlossen, dass PQQ möglicherweise einen Cofaktor der TTH darstellte. Dass PQQ an der TTH gebunden vorliegt und somit als Cofaktor fungiert, wurde auch durch Absorptionsspektren von TTH Reinigungsfractionen gestützt, welche wie das Spektrum von PQQ ein Maximum bei 332 nm aufwiesen (4.2.4).

Mit beiden *tth*-Genen aus *A. ambivalens* wurden jeweils Expressionsversuche in *E. coli* sowohl mit als auch ohne Zugabe von PQQ ins Medium durchgeführt (S. Kilian, unveröffentlicht). Es konnte allerdings keine TTH-Aktivität nachgewiesen werden. Die TTH<sub>af</sub> aus *Acidithiobacillus ferrooxidans* wurde auch in *E. coli* synthetisiert (Kanao *et al.*, 2007). Diese rekombinate TTH wies aber ebenso keine Aktivität auf.

### 5.2.4 Regulation der TTH-Synthese

Über die Regulation in *Acidithiobacilli* ist bekannt, dass die Synthese der TTH aus *A. caldus* substratabhängig ist und wahrscheinlich transkriptional oder translational reguliert wird (Bugaytsova & Lindström, 2004). In mit Schwefel kultivierten Zellen wurde keine TTH-Aktivität nachgewiesen. Das *tetH*-Gen aus *A. caldus* wurde in Anwesenheit von TT, TS und Pyrit aktiviert (Rzhepishchevska *et al.*, 2007). Ebenso findet in *Acidianus ambivalens* eine Regulation der TTH-Synthese statt. Unter anaeroben Bedingungen wird keine TTH und unter aeroben Bedingungen mit  $S^0$  weniger TTH produziert (4.2.5.1.2; Tab. 12). Die Synthese wird durch Anwesenheit von TT im Medium induziert. Allerdings bleibt die Frage offen, wie das durch die TQO vermutlich im Cytoplasma produzierte TT als Zwischenprodukt im Schwefelstoffwechsel weiter oxidiert wird. Dieses TT könnte in einer nicht-enzymatischen Reaktion oder durch ein anderes Protein (TTHX) umgesetzt werden, das bei anderen Bedingungen induziert werden könnte.

### 5.2.5 Wird die TTH auch in anderen Sulfolobales synthetisiert?

In Extrakten von *Sulfolobus solfataricus* und *Sulfurisphaera sp. MC1* wurde keine TTH-Aktivität gemessen (4.2.5.1.2). Daher wird in diesen Organismen wahrscheinlich keine TTH produziert, zumindest unter den vorliegenden Kultivierungsbedingungen. Der heterotrophe Organismus *Sulfolobus solfataricus* wurde ohne ein schwefelhaltiges Substrat und *Sulfurisphaera sp. MC1* nur mit  $S^0$  und ohne TT kultiviert. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass die TTH aufgrund einer Regulation nicht synthetisiert wurde. Allerdings wurden in den Genomen von *Sulfolobus solfataricus* und *S. acidocaldarius* keine *tth*-Gene gefunden. Im Genom von *Metallosphaera sedula* wurde ein *tth*-Gen (Auernik *et al.*, 2008) und in den Genomen von *Sulfurisphaera sp. MC1* und *Sulfolobus tokodaii* jeweils 3 homologe *tth*-Gene gefunden (Kletzin, unveröffentlicht). Ob die TTH auch in anderen Sulfolobales synthetisiert wird, muss also noch in weitergehenden Untersuchungen geklärt werden.

## 5.3 Sulfid-oxidierende Aktivitäten in *A. ambivalens*

Sulfid ( $S^{2-}$ ) ist ein Produkt der im Cytoplasma gelösten Schwefel-Oxygenase/-Reduktase von *A. ambivalens*. In Bakterien wird  $S^{2-}$  unter anderen durch Sulfid-Chinon-Reduktasen (SQRn) oxidiert, wobei Ubichinon reduziert und  $S^{2-}$  oxidiert wird

(Friedrich, 1998; Reinartz *et al.*, 1998; Griesbeck *et al.*, 2000, 2002). In aerob mit  $S^0$  kultivierten *A. ambivalens* Zellen wurde  $S^{2-}$ -oxidierende Aktivität zum einen photometrisch mit Decylubichinon (DQ) als nicht-nativen Elektronenakzeptor nachgewiesen, welche durch die aus der Membran solubilisierten und säulenchromatographisch getrennten Proteine katalysiert wurde (Kap. 4.3.2). Andererseits wurde sie mit einer Sauerstoffelektrode als  $S^{2-}$ -abhängiger Sauerstoffverbrauch gemessen, welcher durch die intakte Membran katalysiert wurde (4.3.3).

### 5.3.1 Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase

#### 5.3.1.1 Lokalisation und Reinigung der SQO

In der Membran-, aber nicht in der löslichen Fraktion wurde eine spezifische Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase (SQO)-Aktivität von  $0,32 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$  mit DQ gemessen (4.3.1). Die SQO war also fest mit der Membran assoziiert. Die analogen Sulfid-Chinon-Redukasen (SQRn) aus den Bakterien *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Chlorobium limicola*, *Paracoccus denitrificans*, *Allochromatium vinosum* und *Aquifex aeolicus* waren ebenso mit der Membran assoziiert (Wakai *et al.*, 2007; Shahak *et al.*, 1992; Schütz *et al.*, 1998; Reinartz *et al.*, 1998; Nübel *et al.*, 2000; zusammengefasst in Griesbeck *et al.*, 2000).

Bei der in drei säulenchromatographischen Schritten durchgeführten Reinigung aus dem Membransolubilisat wurde die SQO mit einer spezifischen Aktivität von  $4,9 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$  um das 9-fache angereichert. Danach war das Enzym allerdings noch nicht rein und enthielt viele kontaminierende Proteine (4.3.1).

0,2% der Schwefel-Oxygenase/-Reduktase (SOR)-Gesamtaktivität des Zellextraktes (cytoplasmatische und Membranfraktion) lagen in der Membranfraktion vor (4.3.1; Tab. 17). Übereinstimmend damit ist die SOR von *Acidianus tengchongensis* nicht nur im Cytoplasma lokalisiert, sondern auch mit der Cytoplasmamembran assoziiert (Chen *et al.*, 2005). In den ersten beiden Reinigungsschritten wurde die SOR nicht von der SQO getrennt (4.3.1). Daher wurde untersucht, ob die SOR SQO-Aktivität aufweist. Zur Kontrolle wurden SQO-Aktivitätstests mit gereinigter SOR durchgeführt. Hierbei wurde keine Aktivität gemessen. Somit konnte eine SQO-Aktivität der SOR ausgeschlossen werden. Die SOR von *A. ambivalens* koppelt nicht die Oxidation von Schwefel mit der aeroben Atmungskette (Müller *et al.*, 2004). Möglicherweise wirken die an der Membran lokalisierte SOR und die SQO *in vivo* dicht beieinander und

bilden einen Superkomplex. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass das Substrat der SQO (Sulfid) ein Produkt der SOR ist.

### 5.3.1.2 Aktivität der SQO

Die Aktivität der SQO mit DQ wurde anaerob bei 70°C gemessen (4.3.2). Aufgrund der hohen Temperatur und der Reaktivität des Substrates  $S^{2-}$  wurde auch in zwei verschiedenen Reaktionspuffern eine hohe nicht-enzymatische Hintergrundsreaktion beobachtet (4.3.2). Erst durch Zugabe von EDTA wurde diese auf ein Minimum verringert, so dass die Aktivität der SQO mit DQ gemessen werden konnte. Daraus wurde geschlossen, dass EDTA Komplexe mit Ionen ausbildete, welche zuvor die Hintergrundsreaktion verursachten. Die maximal gemessene, spezifische SQO-Aktivität mit DQ betrug  $5,3 \text{ U (mg Protein)}^{-1}$  (4.3.1, Tab. 16). Die DQ-Reduktion war von der SQO abhängig, weil sich die Geschwindigkeit proportional zur Menge des Enzyms änderte (4.3.2).

Andere SQRn aus anderen Mikroorganismen weisen Aktivität nur unter strikt anaeroben Bedingungen auf, was durch Zugabe von Glucose-Oxidase und Katalase in den Reaktionsansatz gewährleistet wird (Nübel *et al.*, 2000; Griesbeck *et al.*, 2000, 2002; Wakai *et al.*, 2007). Das trifft für die SQO aus *Acidianus ambivalens* nicht zu. Die NADH-DH aus *A. ambivalens* wurde ursprünglich mit NADH-oxidierender und Chinon-reduzierender Aktivität gereinigt (Gomes *et al.*, 2001a). Es hat sich allerdings herausgestellt, dass die NADH-DH sowohl Sequenzähnlichkeiten mit SQRn als auch unter den genannten, strikt anaeroben Bedingungen SQR-Aktivität aufweist (mündliche Mitteilungen: Bandejas, T., Teixeira, M.). Sie ist jedoch nicht identisch mit der hier angereicherten SQO, weil sie im ersten Reinigungsschritt von der SQO getrennt wurde und unter den hier verwendeten Bedingungen keine SQO-Aktivität aufwies (4.3.1). Möglicherweise ist die NADH-DH empfindlicher gegenüber Sauerstoff als die SQO.

## 5.3.2 Sulfid-oxidierende Aktivität der Membran

### 5.3.2.1 Biochemische Charakterisierung

Mit einer Sauerstoffelektrode wurde ein  $S^{2-}$ -abhängiger Sauerstoffverbrauch katalysiert durch die intakte Membran gemessen, dessen Geschwindigkeit sich proportional zur Menge der Proteine änderte (4.3.2). Dieser folgte bei 50°C und  $Na_2S$  Konzentrationen unter 2,1 mM einer Michaelis-Menten Kinetik mit einem apparenten

$K_M$ -Wert von 0,13 mM Na<sub>2</sub>S (4.3.3.3). Im Vergleich zu bakteriellen SQRn, deren  $K_M$ -Werte für Na<sub>2</sub>S im Bereich von 2 bis 42 µM lagen (zusammengefasst in Griesbeck *et al.*, 2000; Wakai *et al.*, 2007), war dieser Wert in etwa um das 3-fache höher als der höchste bestimmte  $K_M$ -Wert einer bakteriellen SQRn (42 µM). Das würde bedeuten, dass die SQO aus *A. ambivalens* eine geringere Affinität zu Sulfid aufweist. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass einerseits der  $K_M$ -Wert aus technischen Gründen bei 50°C und nicht bei einer optimalen Temperatur von voraussichtlich über 80°C bestimmt wurde. Andererseits wurden die  $K_M$ -Werte der bakteriellen SQOn und der SQO aus *A. ambivalens* mit unterschiedlichen Methoden bestimmt. Zusätzlich zeigte die Verringerung des S<sup>2-</sup>-abhängigen Sauerstoffverbrauchs um das 7-fache nach der Behandlung der Membran mit Protease, dass die gemessene Aktivität zum größten Teil enzymatisch bedingt war (4.3.3).

### 5.3.2.2 Inhibition

Der S<sup>2-</sup>-abhängige Sauerstoffverbrauch durch die intakte Membran wurde durch Kaliumcyanid (KCN), HQNO (Heptylhydroxyquinoline-N-oxide) oder Stigmatellin inhibiert (4.3.3.1). KCN inhibierte erwartungsgemäß in einer sehr geringen Konzentration (10 µM), da es nicht nur ein bekannter Inhibitor der terminalen Chinoloxidase von *A. ambivalens* (Anemüller *et al.*, 1994) sondern auch der bakteriellen SQRn von *Rhodobacter capsulatus*, *Allochromatium vinosum*, *Oscillatoria limnetica* und *Chlorobium limicola* ist (Griesbeck *et al.*, 2000). KCN könnte somit auch ein Inhibitor der SQO aus *A. ambivalens* sein. Die Inhibition durch die Chinonanaloga Stigmatellin und HQNO – beides auch Inhibitoren bakterieller SQRn – erfolgte allerdings in höheren Konzentrationen (125 µM bzw. 600 µM; 4.3.3.1). Die Konzentrationen, bei denen eine Inhibition der SQRn aus Bakterien von 50% der Aktivität eintrat ( $I_{50}$ ), lagen für HQNO im Bereich von 0,5 bis 220 µM und für Stigmatellin im Bereich von 0,005 bis 20 µM (Griesbeck *et al.*, 2000; Wakai *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse wurden so interpretiert, dass die Anlagerung der Chinonanaloga Inhibitoren an die SQO von *A. ambivalens* dadurch erschwert wurde, dass das Enzym noch in der intakten Membran also in den *in vivo* gebildeten Komplexen vorlag. Im Gegensatz dazu war der  $I_{50}$ -Wert für HQNO bezüglich der S<sup>2-</sup>-Oxidation durch die Membran von *Acidithiobacillus ferrooxidans* NASF-1 geringer (50 µM) als für die gereinigte SQR (220 µM) (Wakai *et al.*, 2007).

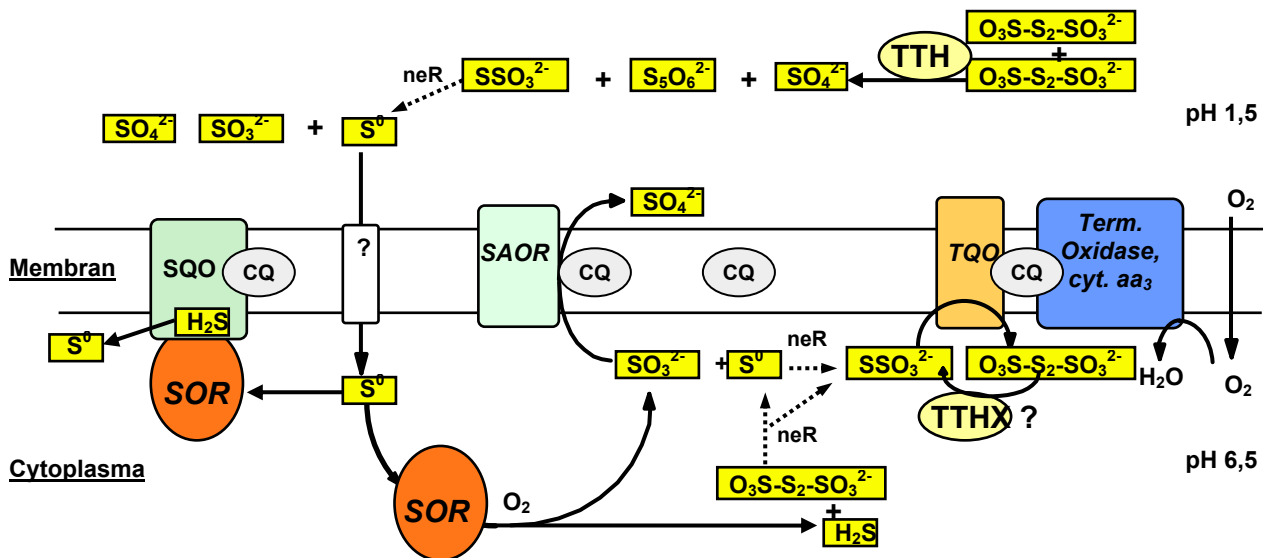
### 5.3.2.3 Kopplung der Oxidation von Schwefelverbindungen mit der Sauerstoffreduktion

Der  $S^{2-}$ -angetriebene Sauerstoffverbrauch durch die intakte Membran war nicht nur Cyanid-sensitiv (4.3.3), sondern erhöhte sich auch proportional bei der Zugabe von gereinigter terminaler Oxidase (4.3.3.2). Daraus wurde geschlossen, dass durch die SQO und/oder NADH-DH Elektronen von Sulfid auf die terminale Chinol-Oxidase transportiert werden. Dass die SQO DQ reduziert und die terminale Oxidase CQ oxidierte, deutete zusätzlich darauf hin, dass CQ und/oder SQ der physiologische Elektronenakzeptor der SQO ist (Thurl *et al.*, 1986; Trincone *et al.*, 1989; Anemüller *et al.*, 1994; Schäfer, 1996; Giuffre *et al.*, 1997; Purschke *et al.*, 1997; 4.3). Weil die SQO also Elektronen in die Atmungskette von *A. ambivalens* einschleust, verstärkt sie wie die TQO den transmembranen Protonengradienten und folglich die ATP Produktion.

## 5.4 Hypothetisches Modell des Schwefelstoffwechsels

Beim Wachstum von *Acidianus ambivalens* unter aeroben Bedingungen mit Tetrathionat (TT) als Energie lieferndes Substrat wird in diesem Modell zuerst TT durch eine extrazelluläre TTH umgesetzt, wobei Pentathionat, Sulfat und Thiosulfat (TS) gebildet werden (Abb. 57). Das entstandene TS disproportioniert aufgrund des niedrigen pH-Wertes (1,5) im Medium in einer nicht-enzymatischen Reaktion zu Schwefel ( $S^0$ ), Sulfat und Sulfit.  $S^0$  wird wie beim Wachstum von *A. ambivalens* mit  $S^0$  auf eine unbekannte Art und Weise in die Zelle transportiert. Dort wird  $S^0$  durch die cytoplasmatische SOR in einer sauerstoffabhängigen Reaktion zu Sulfit und Schwefelwasserstoff disproportioniert. TS wird aufgrund des höheren pH-Wertes (6,5) im Cytoplasma in einer nicht-enzymatischen Reaktion aus  $S^0$  und Sulfit gebildet. Sulfit wird auch durch die SAOR (Sulfit: Akzeptor-Oxidoreduktase) zu Sulfat oxidiert. Ein Teil der gesamten SOR ist mit der Membran assoziiert und könnte einen Superkomplex mit der SQO bilden. Die SQO oxidiert das Produkt Schwefelwasserstoff der SOR und schleust Elektronen über CQ in die Atmungskette ein. CQ wird ebenso durch die TQO reduziert, welche TS zu TT oxidiert. Die Reaktionen der SQO und der TQO verstärken also den transmembranen Protonengradienten und folglich die ATP Produktion. Das durch die TQO im Cytoplasma gebildete TT wird vielleicht entweder durch ein anderes, intrazelluläres Protein (TTHX) umgesetzt oder

reagiert mit Schwefelwasserstoff in einer nicht-enzymatischen Reaktion zu den Produkten  $S^0$  und TS.



**Abb. 57:** Aerober Schwefelstoffwechsel und Energiegewinnung in *Acidianus ambivalens* (Reaktionen nicht stöchiometrisch). SOR: Schwefel-Oxygenase/-Reduktase; CQ : Caldariella Chinon; cyt aa<sub>3</sub>: Cytochrom aa<sub>3</sub> (Terminale Oxidase); SAOR: Sulfit:Akzeptor-Oxidoreduktase; TQO: Thiosulfat:Chinon-Oxidoreduktase; SQO: Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase; TTH: extrazelluläre Tetrathionat-Hydrolase; TTHX: Hypothetisches, intrazelluläres und TT-umsetzendes Protein; neR = nicht-enzymatische Reaktion.

Das vorliegende Modell liefert eine fundierte Grundlage für weitergehende Untersuchungen des aeroben Schwefelstoffwechsels und der Energiegewinnung in thermoacidophilen Archaea. Die TTH und die SQO müssen noch gereinigt und ausführlich charakterisiert werden. Die TQO ist das erste bekannte TS-oxidierende Enzym, welches ein integrales Membranglycoprotein ist, Chinone enthält und diese als Elektronenakzeptoren nutzt, sowohl von Archaea als auch von acidophilen und (hyper)thermophilen Bakterien. Die TQO repräsentiert einen neuen Enzymtypen im TS-oxidierenden Reaktionsweg, unterschiedlich von den verschiedenen TT-bildenden TS-DHn, vom gut untersuchten Sox System und vom TOMES Komplex, welche jeweils kein TT als freiwerdendes Produkt bilden. Interessanterweise wurden homologe Gene nicht nur in verschiedenen Sulfolobales sondern auch im acidophilen Eisen- und Schwefel-oxidierenden Bakterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* und drei Bacteroides Stämmen gefunden (4.1.13). Das deutet auf eine weiter verbreitete Verteilung dieses Reaktionsweges in mesophilen Bakterien hin und wirft die bislang unbeantwortete Frage auf, ob dieser eine generelle Eigenschaft von

---

acidophilen Schwefel-oxidierenden Organismen ist. Die TQO war auch der erste bekannte Eintrittspunkt von Elektronen aus der Oxidation von Schwefelverbindungen in die Elektronentransportkette von *A. ambivalens*. Die Elektronen werden von der TQO entweder direkt über gebundenes CQ oder indirekt über freies CQ zur terminalen Oxidase transportiert. Interessante Fragen, wie das Chinon an das Enzym gebunden ist, wie die Redoxreaktion ohne ein anderes redoxaktives Zentrum außer CQ abläuft und wie der Reaktionsmechanismus aussieht, wurden nicht geklärt. Das Gleiche gilt für die TS-DHn aus *Thiobacilli*. Daher ist die TQO von *A. ambivalens* für zukünftige Untersuchungen ein interessantes Modell, nicht nur für archaeale Enzyme, sondern auch für die Häm-enthaltenden Gegenstücke.



## 6. Literaturverzeichnis

**Albrecht, T. (2004).** Expression von Genen aus dem Schwefelmetabolismus von *Acidianus ambivalens* in dem verwandten *Sulfolobus solfataricus*. **Diplomarbeit**, Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie.

**Anemüller, S. & Schäfer, G. (1990).** Cytochrome *aa3* from *Sulfolobus acidocaldarius* a single-subunit, quinol-oxidizing archaeobacterial terminal oxidase. *Eur. J. Biochem.* **191**, 297–305.

**Anemüller, S., Schmidt, C. L., Pacheco, I., Schäfer, G. & Teixeira, M. (1994).** A cytochrome *aa<sub>3</sub>*-type quinol oxidase from *Desulfurolobus ambivalens*, the most acidophilic archaeon. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**, 275-280.

**Arieli, B., Shahak, Y., Taglicht, D., Hauska, G., & Padan, E. (1994).** Purification and characterization of sulfide-quinone reductase, a novel enzyme driving anoxygenic photosynthesis in *Oscillatoria limnetica*. *J. Biol. Chem.* **269**, 5705–5711.

**Auernik, K. S., Maezato, Y., Blum P. H. & Kelly R. M. (2008).** The genome sequence of the metal-mobilizing, extremely thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula* provides insights into bioleaching-associated metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **74 (3)**, 682-92.

**Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. & Struhl, K. (1998).** Current protocols in molecular biology, Green Publishing Associates an Wiley-Interscience, New York.

**Banciu, H., Sorokin, D. Y., Muyzer, G., Kleerebezem, R., Galinski E. A. & Kuenen, J. G. (2004).** *Thioalkalivibrio halophilus* sp. nov., a novel obligately chemolithoautotrophic facultatively alkaliphilic and extremely salt-tolerant sulfur-oxidizing bacterium from a hypersaline alkaline lake. *Extremophiles* **8**, 325-334.

**Bandeiras, T. M. (2005).** Archaeal Respiratory Chains; Coupling sulphur to oxygen metabolism. **Dissertation**, Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica.

**Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D. & Pace, N. R. (1996).** Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9188-9193.

**Bartsch, R. G. & Kamen, M. D. (1960).** Isolation and properties of two soluble heme proteins in extracts of the photoanaerobe *Chromatium*. *J. Biol. Chem.* **235**, 825–831.

**Baykov, A. A., Evtushenko, O. A. & Avaeva, S. M. (1988).** A Malachite Green Procedure for Orthophosphate Determination and Its Use in Alkaline Phosphatase-Based Enzyme Immunoassay. *Anal. Biochem.* **171**, 266-270.

**Berg, I. A., Kockelkorn, D., Buckel, W. & Fuchs, G. (2007).** A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in Archaea. *Science* **318 (5857)**, 1782-6.

**Boulegue, J. (1978).** Solubility of elemental sulfur in water at 298 K. *Phosphorus Sulfur* **5**, 127-128.

**Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

**Brock, T. D., Brock, K. M., Belly, R. T. & Weiss, R. L. (1972).** *Sulfolobus*: A new genus of sulphur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Microbiol.* **84**, 54-68.

**Brüser, T., Lens, P. & Trüper, H. G. (2000).** The biological sulfur cycle. In *Environmental Technologies to treat Sulfur Pollutions*. Edited by Lens, P. & Hulshoff, L. Pol. London: IWA Publishing.

- Brune, C. (1995).** Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. *In Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, 847-870.
- Bugaytsova, Z. & Lindström, E. B. (2004).** Localization, purification and properties of a tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus caldus*. *Eur. J. Biochem.* **271** (2), 272-80.
- Buonfiglio, V., Polidoro, M., Soyer, F., Valenti, P. & Shively, J. (1999).** A novel gene encoding a sulfur-regulated outer membrane protein in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Biotechnol.* **72**, 85-93.
- Castresana, J., Lübben, M., Saraste, M. & Higgins, D. G. (1994).** Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen. *EMBO J.* **13**, 2516–2525.
- Chen, Z. W., Jiang, C. Y., She, Q., Liu, S. J. & Zhou, P. J. (2005).** Key role of cysteine residues in catalysis and subcellular localization of sulfur oxygenase-reductase of *Acidianus tengchongensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 621-628.
- Claus, H., Akça, E., Debaerdemaker, T., Evrard, C., Declerq, J. P., Harris, J. R., Schlott, B. & König, H. (2005).** Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins. *Can. J. Microbiol.* **51**, 731-743.
- Dahl, C., Engels, S., Pott-Sperling, A. S., Schulte, A., Sander, J., Lubbe, Y., Deuster, O. & Brune, D. C. (2005).** Novel genes of the dsr gene cluster and evidence for close interaction of Dsr proteins during sulfur oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *J. Bacteriol.* **187**, 1392-1404.
- Das, T. K., Gomes, C. M., Teixeira, M. & Rousseau, D. L. (1999).** Redox-linked transient deprotonation at the binuclear site in the aa<sub>3</sub>-type quinol oxidase from *Acidianus ambivalens*: Implications for proton translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 9591-9596.
- 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. & Swanson, R. V. (1998).** The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* **392**, 353–358.
- De Jong, G. A. H., Hazeu, W., Bos, P. & Kuenen, J. G. (1997a).** Polythionate degradation by tetrathionate hydrolase of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol.* **143**, 499-504.
- De Jong, G. A. H., Hazeu, W., Bos, P. & Kuenen, J.G. (1997b).** Isolation of the tetrathionate hydrolase from *Thiobacillus acidophilus*. *Eur. J. Biochem.* **243** (3), 678-683.
- DeLong, E. F. (1992).** Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5658-5689.
- Doeller, J. E., Gaschen, B. K., Parrino, V. & Kraus, D. W. (1999).** Chemolithoheterotrophy in a metazoan tissue: sulfide supports cellular work in ciliated mussel gills. *J. Exp. Biol.* **202**, 1953–1961.
- Doeller, J. E., Grieshaber, M. K. & Kraus, D. W. (2001).** Chemolithoheterotrophy in a metazoan tissue: thiosulfate production matches ATP demand in ciliated mussel gills. *J. Exp. Biol.* **204**, 3755–3764.
- Dolata, M. M., Van Beeumen, J. J., Ambler, R. P., Meyer, T. E. & Cusanovich, M. A. (1993).** Nucleotide sequence of the heme subunit of flavocytochrome c from the purple phototrophic bacterium *Chromatium vinosum*. *J. Biol. Chem.* **268**, 14426–14431.
- Dyall-Smith, M. (Ed.) (2003).** The halohandbook: Protocols for halobacterial genetics/Ver. **4.6**, 40-43/(<http://www.microbiol.uni-melb.edu.au/people/dyallsmith/HaloHandbook>.)

- Edmann, P. & Begg, G. (1967).** A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* **1**, 80–91.
- Eichler, J. (2003).** Facing extremes: archaeal surface-layer (glycol)proteins. *Microbiology* **149**, 3347-51.
- Eisen, J. A., Nelson, K.E., Paulsen, I. T., Heidelberg, J. F., Wu, M., Dodson R. J., Deboy, R., Gwinn, M. L., Nelson, W. C., Haft, D. H., et al. (2002).** The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9509-9514.
- Emmel, T., Sand, W., König, W. A. & Bock, E. (1986).** Evidence for the existence of a sulphur oxygenase in *Sulfolobus brierleyi*. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 3415 – 3420.
- Engelhardt, H. (2007).** Mechanism of osmoprotection by archaeal S-layers: a theoretical study. *J. Struct. Biol.* **160** (2), 190-9.
- Fisher, N. & Rich, P. R. (2000).** A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems. *J. Mol. Biol.* **296**, 1153–1162.
- Friedrich, C. G., Wondra, C., Kostka, S., Egert, M. & Kelly, D. P. (1994).** Identification and Sequence Analysis of the *soxB* Gene Essential for Sulfur Oxidation of *Paracoccus denitrificans* GB17. *J. Bacteriol.* **176**, 6188-6191.
- Friedrich, C. G. (1998).** Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria. *Adv. Microbial. Physiol.* **39**, 235-289.
- Friedrich, C. G., Quentmeier, A., Bardischewsky, F., Rother, D., Kraft, R., Kostka, S. & Prinz, H. (2000).** Novel genes coding for lithotrophic sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17. *J. Bacteriol* **182**, 4677-4687.
- Friedrich, C. G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A. & Fischer, J. (2001).** Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl Environ Microbiol* **67**, 2873-2882.
- Friedrich, C. G., Bardischewsky, F., Rother, D., Quentmeier, A. & Fischer, J. (2005).** Prokaryotic sulfur oxidation. *Curr Opin in Microbiol* **8**, 253-259 ,159-172.
- Fuchs, T., Huber, H., Burggraf, S. & Stetter, K. O. (1996).** 16S rDNA-based phylogeny of the archaeal order *Sulfolobales* and reclassification of *Desulfurolobus ambivalens* as *Acidianus ambivalens* comb. nov. *System. Appl. Microbiol.* **19**, 56-60.
- Garcia-Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J. & Gennis, R. B. (1994).** The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J. Bacteriol.* **176**, 5587–5600.
- Gill, S. & Hippell, P. (1989).** Calculation of protein extinction coefficient from amino acid sequences. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Giuffre, A., Gomes, C. M., Antonini, G., D'Itri, E., Teixeira, M. & Brunori, M. (1997).** Functional properties of the quinol oxidase from *Acidianus ambivalens* and the possible catalytic role of its electron donor - studies on the membrane-integrated and purified enzyme. *Eur. J. Biochem.* **250**, 383-388.
- Gomes, C. M., Bandejas, T. M. & Teixeira, M. (2001a).** A new type-II NADH dehydrogenase from the archaeon *Acidianus ambivalens*: characterization and in vitro reconstitution of the respiratory chain. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 1-8.
- Gomes, C. M., Backgren, C., Teixeira, M., Puustinen, A., Verkhovskaya, M. L., Wikstrom, M. &**

- Verkhovsky, M. I. (2001 b).** Heme-copper oxidases with modified D- and K-pathways are yet efficient proton pumps. *FEBS Lett* **497**, 159-164.
- Griesbeck, C., Hauska, G., & Schütz, M. (2000).** Biological sulfide oxidation: sulfide-quinone reductase (SQR), the primary reaction. In S. G. Pandalai, ed. *Recent research developments in microbiology*, Vol 4, 179–203. Research Signpost, Trivandrum, India.
- Griesbeck, C., Schutz, M., Schodl, T., Bathe, S., Nausch, L., Mederer, N., Vielreicher, M. & Hauska, G. (2002).** Mechanism of sulfide-quinone reductase investigated using site-directed mutagenesis and sulfur analysis. *Biochemistry* **41**, 11552-11565.
- Hallam, S. J., Konstantinidis, K. T., Putnam, N., Schleper, C., Watanabe, Y., Sugahara, J., Preston, C., de la Torre, J., Richardson, P. M. & DeLong, E. F. (2006).** Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103 (48)**, 18296-301.
- Hallberg, K. B., Dopson, M. & Lindström, E. B. (1996).** Reduced sulphur compound oxidation by *Thiobacillus caldus*. *J. Bacteriol.* **178**, 6–11.
- Hanson, T. E. & Tabita, F. R. (2003).** Insights into the stress response and sulfur metabolism revealed by proteome analysis of a *Chlorobium tepidum* mutant lacking the RUBISCO-like protein. *Photosyn. Res.* **78**, 231-248.
- Hazeu, W., Batenburg-van der Vegte, W. H., Bos, P., van der Pas, R. K. & Kuenen, J. G. (1988).** The production and utilization of intermediary elemental sulfur during the oxidation of reduced sulfur compounds by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch. Microbiol.* **150**, 574 –579.
- Hensen, D., Sperling, D., Trüper, H. G., Brune, D. C. & Dahl, C. (2006).** Thiosulphate oxidation in the phototrophic sulphur bacterium *Allochrochromatium vinosum*. *Mol. Microbiol.* **62 (3)**, 794-810.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C. & Stetter, K. O. (2002).** A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417 (6884)**, 63-67.
- Hügler, M., Huber, H., Stetter, K. O. & Fuchs, G. (2003).** Autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathways in archaea (Crenarchaeota). *Arch. Microbiol.* **179 (3)**, 160-73.
- Iciek, M. & Wlodek, L. (2001).** Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulphur. *Pol. J. Pharmacol.* **53**, 215-225.
- Imhoff, J. F., Süling, J. & Petri, R. (1998).** Phylogenetic relationships among the *Chromateaceae*, their taxonomic reclassification and description of the new genera *Allochrochromatium*, *Halochochromatium*, *Isochochromatium*, *Marichrochromatium*, *Thiococcus*, *Thiohalocapsa*, and *Thermochrochromatium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 1129–1143.
- Janiczek, O., Zemanova, J. & Mandl M. (2007).** Purification and some properties of thiosulfate dehydrogenase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **37 (2)**, 101-11.
- Johns, A. R., Taylor, A. C., Atkinson, R. J. A. & Grieshaber, M. K. (1997).** Sulphide metabolism in thalassinidean crustacea. *J. Mar. Biol. Ass. UK* **77**, 127–144.
- Kanao, T., Kamimura, K. & Sugio, T. (2007).** Identification of a gene encoding a tetrathionate hydrolase in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Biotechnol.* **132 (1)**, 16-22.
- Kappler, U., Friedrich, C. G., Trüper, H. G. & Dahl, C. (2001).** Evidence for two pathways of thiosulfate oxidation in *Starkeya novella* (formerly *Thiobacillus novellus*). *Arch. Microbiol.* **175**, 102-111.

- Kelly, D. P., Chambers, L. A. & Trudinger, P. A. (1969).** Cyanolysis and spectrophotometric determination of Trithionate in mixtures with thiosulfate and tetrathionate *Anal. Chem.* **41**, 898 - 901.
- Kelly, D. P. (1982).** Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulphur. *Phil. Trans. R. Soc., Lond., Ser. B* **298**, 499-528.
- Kelly, D. P. (1988).** Oxidation of sulphur compounds. In *The Nitrogen and sulphur cycles*, pp. 65-98. Edited by J. A. Cole & S. J. Ferguson. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kelly, D. P., Shergill, J. K., Lu, W. P. & Wood, A. P. (1997).** Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**, 95-107.
- Kletzin, A. (1989).** Coupled enzymatic production of sulfite, thiosulfate, and hydrogen sulfide from sulfur: Purification and properties of a sulfur oxygenase reductase from the facultatively anaerobic archaeobacterium *Desulfurolobus ambivalens*. *J. Bacteriol.* **171**, 1638-1643.
- Kletzin, A. (1992 a).** Molecular characterization of the *sor* gene, which encodes the sulfur oxygenase reductase of the thermoacidophilic archaeon *Desulfurolobus ambivalens*. *J. Bacteriol.* **174**, 5854-5859.
- Kletzin, A. (1992 b).** Beiträge zu Stoffwechsel und Genregulation der Archaea: Untersuchung von Schwefeloxxygenase/-Reduktase, Hydrogenase und DNA-Ligase aus dem thermoacidophilen Archaeum *Desulfurolobus ambivalens*. **Dissertation**, Ludwig-Maximilians-Universität München, Fakultät für Biologie.
- Kletzin, A. (1994).** Sulfur oxidation and reduction in Archaea: Sulfur oxygenase/-reductase and hydrogenases from the extremely thermophilic and facultatively anaerobic Archaeon *Desulfurolobus ambivalens*. *System. Appl. Microbiol.* **16**, 534-543.
- Kletzin, A., Urich, T., Muller, F., Bandejas, T. M. & Gomes, C. M. (2004).** Dissimilatory oxidation and reduction of elemental sulfur in thermophilic archaea. *J Bioenerg Biomembr.* **36**, 77-91.
- Kostanjevecki, V., Brigé, A., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., Guisez, Y. & van Beeumen, J. (2000).** A membrane-bound flavocytochrome c-sulfide dehydrogenase from the purple phototrophic sulfur bacterium *Ectothiorhodospira vacuolata*. *J. Bacteriol.* **182** (11), 3097-103.
- Kusai, A., & Yamanaka, T. (1973).** Cytochrome c (553, *Chlorobium thiosulfatophilum*) is a sulfide-cytochrome c reductase. *FEBS Lett.* **34**, 235-237.
- Langsford, M. L., Gilkes, N. R., Singh, B., Moser, B., Miller JR., R. C., Warren, R. A. & Kilburn, D. G. (1987).** Glycosylation of bacterial cellulases prevents proteolytic cleavage between functional domains. *FEBS Lett.* **225**, 163-167.
- Laska, S. (2000).** Schwefelatmung in den extrem thermophilen Archaea *Acidianus ambivalens* und *Thermoproteus*. **Dissertation**, Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie.
- Laska, S., Lottspeich, F. & Kletzin, A. (2003).** Membrane-bound hydrogenase and sulfur reductase of the hyperthermophilic and acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. *Microbiol.* **149**, 2357-2371.
- Lauber, K. (2006).** Schwefel-Mobilisierung bei *Acidianus ambivalens*. **Dissertation**, Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie.
- Lottspeich, F. & Zorbas, H. (1998).** Bioanalytik. 1. Aufl., Spektrum, Heidelberg, Teil IV, 571-778.
- Lu, W.-P. & Kelly, D. P. (1988).** Kinetic and energetic aspects of inorganic sulphur compound oxidation by *Thiobacillus tepidarius*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 865 - 876.
- Lu, W.-P. & Kelly, D. P. (1988).** Cellular location and partial purification of the "thiosulfate-oxidizing

enzyme" and "trithionate hydrolase" from *Thiobacillus tepidarius* *J. Gen. Microbiol.* **134**, 877 - 885.

**Lytic, R. M. & Suzuki, I. (1970).** Enzymes involved in the metabolism of thiosulfate by *Thiobacillus thioparus*. *Can. J. Biochem.* **48**, 335-363.

**Meulenberg, R., Pronk, J. T., Hazeu, W., Bos, P. & Kuenen, J. G. (1992).** Oxidation of reduced sulfur compounds by intact cells of *Thiobacillus acidophilus*. *Arch. Microbiol.* **157**, 161-168.

**Meulenberg, R., Pronk, J. T., Hazeu, W., Van Dijken JP, Frank, j., Bos, P. & Kuenen, J. G. (1993).** Purification and partial characterization of thiosulphate dehydrogenase from *Thiobacillus acidophilus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2033-2039.

**Meyer, T. E. & Cusanovich, M. A. (2003).** Discovery and characterization of electron transfer proteins in the photosynthetic bacteria. *Photosynth Res.* **76 (1-3)**, 111-26.

**Moll, R. & Schäfer, G. (1988).** Chemiosmotic H<sup>+</sup> cycling across the plasma membrane of the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *FEBS Lett.* **232**, 359-363.

**Mortimer, C. E. (1996):** Chemie. Das Basis-Wissen der Chemie. Thieme, Stuttgart, 6. Aufl., Kap.24, 405-421.

**Müller, F. (2003).** Reinigung und Charakterisierung einer membrangebundenen Thiosulfat:Akzeptor-Oxidoreduktase aus dem thermoacidophilen Archaeon *Acidianus ambivalens*. **Diplomarbeit**, Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie.

**Müller, F. H., Bandejas, T. M., Urich, T., Teixeira, M., Gomes, C. M. & Kletzin, A. (2004).** Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Mol. Microbiol.* **53 (4)**, 1147-1160.

**Musser, S. M., Stowell, M. H. M. & Chan, S. I. (1993).** Comparison of ubiquinol and cytochrom c terminal oxidases. An alternative view. *FEBS Lett.* **327**, 131-136.

**Nakamura, K., Nakamura, M., Yoshikawa, H. & Amano, Y. (2001).** Purification and properties of thiosulfate dehydrogenase from *Acidithiobacillus thiooxidans* JCM7814. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 102-108.

**Nübel, T., Klughammer, C., Huber, R., Hauska, G. & Schütz, M. (2000).** Sulfide:quinone oxidoreductase in membranes of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus* (VF5) *Arch. Microbiol.* **173**, 233-244.

**O'Brien, J. & Vetter, R. D. (1990).** Production of thiosulfate during sulphide oxidation by mitochondria of the symbiont-containing bivalve *Solemya reidi*. *J. Exp. Biol.* **149**, 133-148.

**Olsen, O. & Thomsen, K. K. (1991).** Improvement of bacterial  $\beta$ -glucanase thermostability by glycosylation. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 579-585.

**Pachmair, F. (1960).** Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen in Mineralwasser. München: Justus-Maximilian Universität.

**Parrino, V., Kraus, D. W. & Doeller, J. E. (2000).** ATP Production from the oxidation of sulfide in gill mitochondria of the ribbed mussel *Geukensia demissa*. *J. Exp. Biol.* **202**, 2209-2218.

**Porath, U., Pazmandy, K., Plueckthun, H. & Schreier, K. (1960).** Investigations on the half-life of serum albumin which was isolated by precipitation with neutral salts or with TCA. *Clin. Chim. Acta.* **5**, 54-58.

**Pott, A. S. & Dahl, C. (1998).** Sirohaem-sulfite reductase and other proteins encoded in the *dsr* locus

of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulphur. *Microbiol.* **144**, 1881–1894.

**Purschke, W. G., Schmidt, C. L., Petersen, A. & Schäfer, G. (1997).** The terminal quinol oxidase of the hyperthermophilic archaeon *Acidianus ambivalens* exhibits a novel subunit structure and gene organization. *J. Bacteriol.* **179**, 1344–1353.

**Quentmeier, A. & Friedrich, C. G. (2001).** The cysteine residue of the SoxY protein as the active site of protein-bound sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17. *FEBS Lett.* **503**, 168–172.

**Quentmeier, A., Hellwig, P., Bardischewsky, F., Wichmann, R., Friedrich, C. G., (2004).** Sulfide dehydrogenase activity of the monomeric flavoprotein SoxF of *Paracoccus pantotrophus*. *Biochemistry* **43 (46)**, 14696–703.

**Reinartz, M., Tschape, J., Bruser, T., Truper, H. G. & Dahl, C. (1998).** Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **170**, 59–68.

**Reysenbach, A. L., Longnecker, K. & Kirshtein, J. (2000).** Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3798–3806.

**Rich, P. R. (1984).** Electron and proton transfers through quinones and cytochrome *bc* complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* **768**, 53–79.

**Richter, O.-M. H. & Schäfer, G. (1992).** Purification and enzymic characterization of the cytoplasmic pyrophosphatase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Eur. J. Biochem.* **209**, 343–349.

**Rohwerder, T. & Sand, W. (2003).** The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiol.* **149**, 1699–1710.

**Rother, D., Henrich, H. J., Quentmeier, A., Bardischewsky, F. & Friedrich, C. G. (2001).** Novel genes of the sox gene cluster, mutagenesis of the flavoprotein SoxF, and evidence for a general sulfur-oxidizing system in *Paracoccus pantotrophus* GB17. *J. Bacteriol.* **183**, 4499–4508.

**Roy, A. B. & Trudinger, P. A. (1970).** *The biochemistry of inorganic compounds of sulphur.* Cambridge: Cambridge University Press.

**Rzhepishevskaya, O. I., Valdés, J., Marcinkeviciene, L., Gallardo, C. A., Meskys, R., Bonnefoy, V., Holmes, D.S. & Dopson, M. (2007).** Regulation of a novel *Acidithiobacillus caldus* gene cluster involved in metabolism of reduced inorganic sulfur compounds. *Appl Environ Microbiol.* **73 (22)**, 7367–72.

**Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Third Edition.

**Schäfer, G., Anemüller, S., Moll, R., Meyer, W. & Lübben, M. (1990).** Electron transport and energy conservation in the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *FEMS Microbiology Letters* **75 (2-3)**, 335–348.

**Schäfer, G., Purschke, W. & Schmidt, C. L. (1996a).** On the origin of respiration: electron transport proteins from archaea to man. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**, 173–188.

**Schäfer, G., Purschke, W. G., Gleissner, M. & Schmidt, C. L. (1996b).** Respiratory chains of archaea and extremophiles. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1275**, 16–20.

**Schäfer, G., Engelhard, M. & Müller, V. (1999).** Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol. Mol. Biol.*

Rev. **63**, 570-620.

**Schägger, H. & von Jagow, G. (1987).** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDa. *Anal. Biochem.* **173**, 201-205.

**Schägger, H. (2006).** Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **1** (1), 16-22.

**Schütz, M., Shahak, Y., Padan, E. & Hauska, G. (1997).** Sulfidequinone reductase from *Rhodobacter capsulatus*. *J. Biol. Chem.* **272**, 9890-9894.

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

**Seegerer, A. H. & Stetter, K. O. (1992).** The Order Sulfolobales. In *The prokaryotes*. Editoren: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K. M. Springer, Berlin, Heidelberg, 684-701.

**Seegerer, A. H., Burggraf, S., Fiala, G., Huber, G., Huber, R., Pley, U. & Stetter, K. O. (1993).** Life in hot springs and hydrothermal vents. *Origins Life Evol. Biosphere* **23**, 77-90.

**Shahak, Y., Arieli, B., Padan, E. & Hauska, G. (1992).** Sulfide quinone reductase (SQR) activity in *Chlorobium*. *FEBS Lett.* **299**, 127-130.

**Shahak, Y., Klughammer, C., Schreiber, U., Padan, E., Herrmann, I. & Hauska, G. (1994).** Sulfide-quinone and sulfide-cytochrome reduction in *Rhodobacter capsulatus*. *Photosynthesis Res.* **39**, 175-181.

**Silver, M. & Lundgren, D. G. (1968).** The thiosulfate-oxidizing enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Biochem.* **46**, 1215 - 1220.

**Sojar, H.T. & Bahl, O. P. (1987).** Chemical deglycosylation of glycoproteins. *Methods Enzymol.* **138**, 341-50.

**Sorokin, D. Y., Banciu, H., van Loosdrecht, M. C. M. & Kuenen, J. G. (2003).** Growth physiology and competitive interaction of obligately chemolithoautotrophic, halophilic, sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes. *Extremophiles* **7**, 195-203.

**Sreerama, N. & Woody, R. W. (2000).** Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **287**, 252-260.

**Steinmetz, M. A. & Fischer, U. (1981).** Cytochromes of the non-thiosulfate-utilizing green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*. *Arch. Microbiol.* **130**, 31-37.

**Stetter, K. O., Fiala, G., Huber, G., Huber H. & Seegerer, A. (1990).** Hyperthermophilic microorganism. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**, 117-124.

**Stetter, K. O. (1996).** Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**, 149-158.

**Stetter, K. O. (2006).** Hyperthermophiles in the history of life. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **361** (1474), 1837-43.

**Stetter, K. O. (2006).** History of discovery of the first hyperthermophiles. *Extremophiles.* **10** (5), 357-62, Review.



- Steudel, R., Holdt, G., Göbel, T. & Hazeu, W. (1987).** Chromatographic separation of higher polythionates  $S_nO_6^{2-}$  ( $n=3\dots 22$ ) and their detection in cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*; molecular composition of bacterial sulfur secretion. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **26**, 151-153.
- Steudel, R. (2000).** The chemical sulfur cycle. In *Environmental Technologies to treat Sulfur Pollutions*. Edited by Lens, P. & Hulshoff, L., Pol. London: IWA Publishing.
- Sugio, T., Kanao, T., Furukawa, H., Nagasawa, T. & Blake, R. C. I. I. (1996).** Isolation and identification of an iron-oxidizing bacterium which can grow on tetrathionate medium and the properties of a tetrathionate-decomposing enzyme isolated from the bacterium. *J. Ferment. Bioengin.* **82**, 233-238.
- Suzuki, I. (1965a).** Oxidation of elemental sulfur by an enzyme system of *Thiobacillus thiooxidans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **104**, 359-371.
- Suzuki, I. (1965b).** Incorporation of atmospheric oxygen-18 into thiosulfate by the sulfur-oxidizing enzyme of *Thiobacillus thiooxidans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **110**, 97-101.
- Suzuki, I. & Silver, M. (1966).** The initial product and properties of the sulfur-oxidizing enzyme of thiobacilli. *Biochim. Biophys. Acta.* **122**, 22-33.
- Suzuki, I. (1999).** Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Can. J. Microbiol.* **45**, 97-105.
- Tabita, F. R. & Hanson T. E. (2005).** Anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbial Genomes*. Human Press Inc. 225-243.
- Tano, T., Kitaguchi, H., Harada, K., Nagasawa, T. & Sugio, T. (1996).** Purification and some properties of tetrathionate decomposing enzyme from *Thiobacillus thiooxidans*. *Biosci. Biotechn. Biochem.* **60**, 224-227.
- Teixeira, M., Batista, R., Campos, A. P., Gomes, C., Mendes, J., Pacheco, I., Anemuller, S. & Hagen, W. R. (1995).** A seven-iron ferredoxin from the thermoacidophilic archaeon *Desulfurolobus ambivalens*. *Eur. J. Biochem.* **227**, 322-327.
- Thauer, R. K., Jungermann, K. & Decker, K. (1977).** Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **41**, 100-180.
- Theissen, U., Hoffmeister, M., Grieshaber, M. & Martin, W. (2003).** Single eubacterial origin of eukaryotic Sulfide:Quinone Oxidoreductase, a mitochondrial enzyme conserved from the early evolution of eukaryotes during anoxic and sulfidic times. *Mol. Biol. Evol.* **20 (9)**, 1564-1574.
- Thurl, S., Witke, W., Buhrow, I. & Schafer, W. (1986).** Quinones from archaeobacteria, II. Different types of quinones from sulphur-dependent archaeobacteria. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **367**, 191-197.
- Trincone, A., Lanzotti, V., Nicolaus, B., Zillig, W., Derosa, M. & Gambacorta, A. (1989).** Comparative lipid-composition of aerobically and anaerobically grown *Desulfurolobus ambivalens*, an autotrophic thermophilic archaeobacterium. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 2751-2757.
- Trudinger, P. A. (1961).** Thiosulphate oxidation and cytochromes in *Thiobacillus X*: 1. Fractionation of bacterial extracts and properties of cytochromes. *Biochem. J.* **78**, 673 - 679.
- Trudinger, P. A. (1961).** Thiosulphate oxidation and cytochromes in *Thiobacillus X*: 2. Thiosulphate-oxidizing enzyme. *Biochem. J.* **78**, 680 - 686.
- Trumpower, B. L. & Gennis, R. B. (1994).** Energy transductions by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration, *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 675-716.

- Urich, T. (2001).** Ein neuer Stoffwechselweg bei Archaea; Untersuchungen zur anaeroben Schwefeldisproportionierung bei *Acidianus ambivalens* und *Sulfurisphaera* sp. **Diplomarbeit**, Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie.
- Urich, T., Bandejas T. M., Leal, S. S., Rachel, R., Albrecht, T., Zimmermann, P., Scholz, C., Teixeira, M., Gomes, C. M. & Kletzin, A. (2004).** The sulphur oxygenase reductase from *Acidianus ambivalens* is a multimeric protein containing a low-potential mononuclear non-haem iron centre. *Biochem J.* **381 (Pt 1)**, 137-46.
- Urich, T. (2005).** The Sulfur Oxygenase Reductase from *Acidianus ambivalens*: Functional and structural characterization of a sulfur-disproportionating enzyme. **Dissertation**, Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie.
- Vande Weghe, J.G. & Ow, D. W. (1999).** A fission yeast gene for mitochondrial sulfide oxidation. *J. Biol. Chem.* **274 (19)**, 13250-13257.
- Veith, A. (2006).** Untersuchungen von S-Layer Proteinen aus *Acidianus ambivalens*: Proteinisolierung, Nukleinsäuresequenzierung und heterologe Expression des Gens. **Diplomarbeit**, Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie.
- Visser, J. M., de Jong, G. A. H., Robertson, L. A. & Kuenen, J. G. (1997a).** Purification and characterization of a periplasmic thiosulfate dehydrogenase from the obligately autotrophic *Thiobacillus* sp. W5. *Arch. Microbiol.* **166**, 372-378.
- Visser, M., de Jong, G. A. H., Robertson, L. A. & Kuenen, J. G. (1997b).** A novel membrane-bound flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from the colourless sulfur bacterium *Thiobacillus* sp. W5. *Arch. Microbiol.* **167**, 295-301.
- Völkel, S. & Grieshaber, M. K. (1992).** Mechanisms of sulfide tolerance in the peanut worm *Sipunculus nudus* (Sipunculida) and in the lugworm *Arenicola marina* (Polychaeta). *J. Comp. Physiol. B* **162**, 469-477.
- Völkel, S. & Grieshaber, M. K. (1996a).** Mitochondrial sulfide oxidation in *Arenicola marina*: evidence for alternative electron pathways. *Eur. J. Biochem.* **235**, 231-237.
- Völkel, S. & Grieshaber, M. K. (1996b).** Sulphide oxidation and oxidative phosphorylation in the mitochondria of the lugworm *Arenicola marina*. *J. Exp. Biol.* **200**, 83-92.
- Wakagi, T., Lee, C. H. & Oshima, T. (1992).** An extremely stable inorganic pyrophosphatase purified from the cytosol of a thermoacidophilic archaebacterium, *Sulfolobus acidocaldarius* strain 7. *Biochim. Biophys. Acta.* **1120 (3)**, 289-296.
- Wakai, S., Tsujita, M., Kikumoto, M., Manchur, M. A., Kanao, T. & Kamimura, K. (2007).** Purification and characterization of sulfide:quinone oxidoreductase from an acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71 (11)**, 2735-42.
- Wardi, A. H. & Michos, G. A. (1972).** Alcian blue staining of glycoproteins in acrylamide disc electrophoresis. *Anal. Biochem.* **49**, 607-609.
- Watters, C. (1978).** A one-step biuret assay for protein in the presence of detergent. *Anal. Biochem.* **88**, 695-698.
- Wentzien, S., Sand, W., Albertsen, A. & Steudel, R. (1994).** Thiosulfate and tetrathionate degradation as well as biofilm generation by *Thiobacillus intermedius* and *Thiobacillus versutus* studied by microcalorimetry, HPLC, and ion-pair chromatography. *Arch. Microbiol.* **161**, 116-125.

- 
- Wodara, C., Bardischewsky, F., & Friedrich, C. G. (1997).** Cloning and characterization of sulfite dehydrogenase, two *c*-type cytochromes, and a flavoprotein of *Paracoccus denitrificans* GB17: essential role of sulfite dehydrogenase in lithotrophic sulfur oxidation. *J. Bacteriol.* **179**, 5014–5023.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990).** Towards a natural system of organism: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576–4579.
- Woese, C. R. (2000).** Interpreting the universal phylogenetic tree. *PNAS* **97**, 8392–8396.
- Woese, C. R. (2002).** On the evolution of cells. *PNAS* **99**, 8742 – 8747.
- Yong, R. & Searcy, D. G. (2001).** Sulfide oxidation coupled to ATP synthesis in chicken liver mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol. B* **129**, 129–137.
- Zillig, W., Stetter, K.O., Wunderl, S., Schulz, W., Priess, H. & Scholz, I. (1980).** The *Sulfolobus*-„Caldariella“ group: taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA-polymerases. *Arch. Microbiol.* **125**, 259-269.
- Zillig, W., Yeats, S., Holz, I., Böck, A., Gropp, F., Rettenberger, M. & Lutz, S. (1985).** Plasmid-related anaerobic autotrophy of the novel archaeobacterium *Sulfolobus ambivalens*. *Nature* **313**, 789-791.
- Zillig, W., Yeats, S., Holz, I., Böck, A., Rettenberger, M., Gropp, F. & Simon, G. (1986).** *Desulfurolobus ambivalens* *gen. nov., sp. nov.*, an autotrophic archaeobacterium facultatively oxidizing and reducing sulfur. *System. Appl. Microbiol.* **8**, 197-203.
- Zimmermann, P., Laska, S. & Kletzin, A. (1999).** Two modes of sulfite oxidation in the extremely thermophilic and acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. *Arch. Microbiol.* **172**, 76-82.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abs. 280 nm	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BisTris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CQ	Caldariella Chinon
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DH	Dehydrogenase
DM	n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DQ	Decylubichinon
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	doppelt deionisiertes Wasser
HCl	Salzsäure
HQNO	Heptylhydroxyquinoline-N-oxide
HTP	Hydroxyapatit
K	Kilo
K <sub>M</sub>	Michaelis-Konstante
k <sub>cat</sub>	Wechselzahl
KCN	Kaliumcyanid
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasenpaare
KP <sub>i</sub>	Kaliumphosphatpuffer
Kap.	Kapitel
KPE	Kaliumphosphatpuffer mit EDTA
l	Liter
Leitf.	Leitfähigkeit
m	Meter
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation- <i>time of flight</i>
MF	Membranfraktion
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
min	Minute(n)
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
mS	Millisiemens
$\mu$	Mikro

---

n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Na <sub>2</sub> S	Natriumsulfid
Opt.	Optimum
ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEX	Proteinextrakt
PQQ	Pyrrlochinolin-Chinon
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S°	Schwefel
SAOR	Sulfit: Akzeptor-Oxidoreduktase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
SQ	Sulfolobus Chinon
SOR	Schwefel-Oxygenase/-Reduktase
SQO (= SQR)	Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase (Sulfid-Chinon-Reduktase)
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TFMS	Trifluormethan-Sulfonsäure
TQO	Thiosulfat-Chinon-Oxidoreduktase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Thiosulfat
TS-DH	Thiosulfat-Dehydrogenasen
TT	Tetrathionat
TTH	Tetrathionat-Hydrolase
TTHX	Hypothetisches, intrazelluläres und TT-umsetzendes Protein
TXRF	Röntgenstrahlen-Fluoreszenzspektroskopie
U	Unit(s)
üN	über Nacht
v	Reaktionsgeschwindigkeit
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
VSG	variables Oberflächenprotein von Trypanosomen
w/v	Gewicht pro Volumen

---

## 8. Anhang

### 8.1 Lebenslauf

Name	Fabian Müller	
Geburtstag	25.03.1976	
Geburtsort	Langen (Hessen)	
Schulausbildung	1982-1986	Grundschule: Ludwig-Erk, Dreieich
	1986-1995	Gymnasium: Lessing, Frankfurt a.M.
	1995	Abitur
Akademische Ausbildung	1995-2003	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt
	2002	Diplomprüfung
	2002-2003	Diplomarbeit bei PD Dr. A. Kletzin an der Technischen Universität Darmstadt
	2003-2008	Promotionsarbeit bei PD Dr. A. Kletzin an der Technischen Universität Darmstadt

## 8.2 Erklärungen

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Dr. Arnulf Kletzin in der Abteilung von Frau Professor Dr. Felicitas Pfeifer an der Technischen Universität Darmstadt am Institut für Mikrobiologie und Genetik im Zeitraum von Juli 2003 bis März 2008 angefertigt. Ein Teil der Arbeit wurde in Portugal am ITQP/UNL (Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica, Universidade Nova de Lisboa, Oeiras) in der Arbeitsgruppe von Miguel Teixeira im Rahmen einer Kooperation und finanziert durch ein Stipendium von der EU (Marie Curie; Nr.: HPMT-CT-2001-00389) vom 15.02.2004 bis zum 15.02.2005 durchgeführt.

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

A. KLETZIN, T. URICH, **F. MÜLLER**, T.M. BANDEIRAS & C.M. GOMES (2004). Dissimilatory oxidation and reduction of elemental sulfur in thermophilic archaea. *J Bioenerg Biomembr* 36, 77-91. Review.

**F.H. MÜLLER**, T.M. BANDEIRAS, T. URICH, M. TEIXEIRA, C.M. GOMES & A. KLETZIN (2004). Coupling of the pathway of sulfur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulfate:quinone oxidoreductase. *Mol Microbiol* 53 (4), 1147-60.

Ein Teil der Ergebnisse aus der Veröffentlichung „Müller et al., 2004“ wurde bereits in der Diplomarbeit (Müller, 2003) erzielt, insbesondere die Reinigung der TQO.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Weiterhin erkläre ich, dass ich bisher keinen Versuch unternommen habe, an einer deutschen oder ausländischen Universität zu promovieren.

Darmstadt, den 10.04.2008

(Fabian Müller)

---

### 8.3 Danksagung

Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen, und die zeitweise Finanzierung.

Danke Arnulf für die Bereitstellung des interessanten Themas und ganz besonders für deine vielfältige Unterstützung.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe insbesondere Thorsten, Katharina, Simone und Sandra danke ich für das gute Arbeitsklima und Karin, Christian, Sabrina, Tim, Rita, Melli und Andi für eine schöne Laborzeit.

Vom Instituto de Tecnologia Quimica e Biologica der Universidade Nova de Lisboa in Oeiras (Portugal) danke ich Claudio Gomes, Miguel Teixeira und vor allem Tiago Bandejas und Joao Vicente für die hervorragende Zusammenarbeit und die daraus resultierende Freundschaft.

Der AG Haider danke ich für Speis und Trank, immer wenn ich kurz vorm Verhungern war, vor allem Marie-Louise.

Bei Gudrun, Daggi, Martin und Salome bedanke ich mich dafür, dass sie sich um Joe gekümmert haben.

Danke Simon, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest.

Danke Marius für's Korrekturlesen in Afrika!

Besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben.