
Struktur und Funktion respiratorischer Cytochrom c- Sulfitreduktase-Systeme

Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Dissertation

von Jakob Eller

aus Trier

1. Referent: Prof. Dr. Jörg Simon

2. Referent: PD Dr. Arnulf Kletzin

Darmstadt 2019

Eller, Jakob: Struktur und Funktion respiratorischer Cytochrom *c*-Sulfitreduktase-Systeme

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUPrints: 2019

Tag der Einreichung: 24.09.2019

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2019

urn:nbn:de:tuda-tuprints-91104

Veröffentlicht unter CC-BY-ND 4.0

„Manches steht in unserer Macht, manches nicht. In unserer Macht steht das Denken, das Handeln, das Verlangen, das Meiden – dies sind also alle Dinge in uns. Nicht in unserer Macht gegeben sind Körper, Besitz, Ansehen und Würden – also alles außer uns.“

— **Epiktet**, griechischer Philosoph und römischer Sklave (Enchiridion)

„Du hast die Macht über deinen Geist - nicht über Geschehnisse im Außen. Erkenne dies und Du wirst Stärke finden.“

— **Mark Aurel**, römischer Philosoph und Kaiser (Selbstbetrachtungen)

Meiner Familie und Freunden gewidmet.

1. Inhaltsverzeichnis

1.....Inhaltsverzeichnis	I
2.....ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
3.....ZUSAMMENFASSUNG	3
4.....EINLEITUNG	4
4.1. Sulfitreduktion und der biogeochemische Schwefelkreislauf	4
4.2. Mikrobielle Dissimilatorische Sulfitreduktasen	5
4.2.1. Dsr-Sulfitreduktasen	5
4.2.2. Mcc-Sulfitreduktasen	6
4.3. <i>Wolinella succinogenes</i> als Modellorganismus	8
4.4. Der <i>mcc</i> -Gencluster von <i>Wolinella succinogenes</i>	9
4.5. Regulation der <i>mcc</i> -Genexpression	12
4.6. Ziele dieser Arbeit	14
5.....MATERIAL UND METHODEN	15
5.1. Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	15
5.2. Verwendete Plasmide und Oligonukleotide	18
5.2.1. Oligonukleotide	18
5.2.2. Plasmide	22
5.3. Verwendete Stämme und Mutanten	23
5.4. Nährmedien	25
5.4.1. Medien für die Kultivierung von <i>Wolinella succinogenes</i>	25
5.4.2. Medien für die Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	27
5.4.3. Verwendete Antibiotika	28
5.5. Zellzucht	28
5.5.1. Zellzucht von <i>Wolinella succinogenes</i>	28
5.5.2. Zellzucht von <i>Escherichia coli</i>	29
5.5.3. Messung der optischen Dichte	29
5.6. Molekularbiologische Methoden	29
5.6.1. Polymerase-Kettenreaktion	29
5.6.2. Agarose-Gelelektrophorese und qualitative Detektion von DNA	29
5.6.3. Reinigung von DNA	30
5.6.4. Strategien der Plasmidkonstruktion	30
5.6.5. Sequenzierung erstellter Plasmide und PCR-Amplifikate	33
5.7. Mikrobiologische Methoden	33
5.7.1. Transformation von <i>Escherichia coli</i>	33
5.7.2. Transformation von <i>Wolinella succinogenes</i>	33
5.8. Produktion von Mcc-Proteinen	34
5.8.1. Heterologe Proteinproduktion in <i>Escherichia coli</i>	34

5.8.2.	Proteinproduktion in <i>Wolinella succinogenes</i>	34
5.8.3.	Zellernte von <i>Wolinella succinogenes</i>	35
5.8.4.	Zellernte von <i>Escherichia coli</i>	35
5.8.5.	Zellaufschluss und Fraktionierung	35
5.8.6.	Proteinreinigung mittels Affinitäts-Chromatographie	36
5.8.7.	Konzentrierung von Proteinlösungen	36
5.8.8.	Bestimmung der Proteinkonzentration	37
5.9.	Proteinanalytische Methoden	37
5.9.1.	Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE	37
5.9.2.	Anfärben von Proteinen mittels Coomassie G250	38
5.9.3.	Häm-Färbung nach Francis und Becker	39
5.9.4.	Western Blot von separierten Proteinen	39
5.9.5.	Immunodetektion von affinitätsgetagten Proteinen	40
5.9.6.	Kolorimetrische Eisen-Bestimmung	41
5.9.7.	Aufnahme von UV/Vis-Spektren von MccA	42
5.9.8.	Bestimmung der Häm <i>c</i> -Konzentration	42
5.9.9.	Gelfiltration von MccA	42
5.9.10.	Cyclovoltammetrische Charakterisierung von MccA	43
5.9.11.	Chronoamperometrische Charakterisierung von MccA	43
5.9.12.	Rekonstitution von MBP-TEV-MccC-Strep mit [4Fe4S]-Zentren	44
5.9.13.	Bestimmung des Kupfergehaltes mit 2,2'-Bichinolin	44
5.9.14.	Rekonstitution von MccL mit Cu(I)	45
5.10.	Charakterisierung der Mcc-abhängigen Sulfitatmung	45
5.10.1.	Aufnahme des Wachstums von <i>W. succinogenes</i>	45
5.10.2.	Messung des Elektronentransportes zwischen Formiat und Sulfit	46
5.10.3.	Bestimmung der Sulfit-Konzentration	47
5.10.4.	Bestimmung der Sulfid-Konzentration	47
5.10.5.	Bestimmung der Formiat-Konzentration	48
5.10.6.	Bestimmung der Anteile von Menachinon und 8-Methylmenachinon	49
5.11.	Bioinformatische Methoden	49
5.11.1.	Modellierung der Tertiär- und Quartärstrukturen von MccC und MccD	49
5.11.2.	Phylogenetische Analyse von MccA	50
5.11.3.	Vergleich von MccC-Homologen	50
5.11.4.	Identifikation von <i>mcc</i> -Genclustern	50
6.....	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	51
6.1.	Das Zweikomponentensystem MccRS	51
6.1.1.	Deletion von <i>mccRS</i>	51
6.1.2.	Verlängerung des Leserahmens von <i>mccR</i>	53
6.1.3.	Diskussion	57
6.2.	Rolle der Gene des <i>mcc</i> -Genclusters	59

6.2.1.	Deletion der <i>mcc</i> -Gene	59
6.2.2.	Diskussion	65
6.3.	Untersuchung der Cu(I)-abhängigen MccA-Aktivität	68
6.3.1.	Charakterisierung von MccA und dessen Cystein-Austauschvarianten	68
6.3.2.	UV/Vis-Spektren von MccA	72
6.3.3.	Gelfiltration von MccA	74
6.3.4.	Elektrokinetische Untersuchung von MccA	75
6.3.5.	Diskussion	79
6.4.	Der MccCD-Komplex	81
6.4.1.	Struktur und Funktion von MccC und MccD	81
6.4.2.	Heterologe Produktion und Reinigung von MccC	85
6.4.3.	Eisenbeladung von MBP-TEV-MccC-Strep	87
6.4.4.	Rekonstitution mit Eisen-Schwefel-Zentren	87
6.4.5.	Diskussion	89
6.5.	Das Kupferchaperon MccL	92
6.5.1.	Produktion von MccL in <i>Wolinella succinogenes</i> und Mutagenese der Kupfer-Bindemotive	92
6.5.2.	Produktion von MccL in <i>Escherichia coli</i>	95
6.5.3.	Kupferbeladung von MccL	96
6.5.4.	Diskussion	98
6.6.	Die Rolle von 8-Methylmenachinon für die Sulfitatmung	101
6.6.1.	Anteil von 8-Methylmenachinon im Menachinonpool in Abhängigkeit vom Elektronenakzeptor	101
6.6.2.	Sulfitatmung bei Fehlen von 8-Methylmenachinon	102
6.6.3.	Diskussion	105
6.7.	Phylogenetische Analysen	106
6.7.1.	Phylogenetische Einordnung der MccA-Homologe	106
6.7.2.	Diversität der <i>mcc</i> -Gencluster	109
6.7.3.	Diskussion	115
7.....	AUSBLICK	118
8.....	LITERATURVERZEICHNIS	121
9.....	ANHANG	130
10. ..	PUBLIKATIONEN	135
11. ..	PRÄSENTATION AUF WISSENSCHAFTLICHEN KONGRESSEN	136
12. ..	BEITRÄGE ANDERER	137
13. ..	DANKSAGUNG	138
14. ..	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	139

2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

8-MMK	8-Methyl-Menachinon-6
8-MMKH ₂	8-Methyl-Menachinol-6
<i>aadA</i>	Spektinomycin-Resistenzgen-Kassette
AHT	Anhydrotetrazyklin
amp	Ampicillin-Resistenzgen-Kassette
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
<i>apr</i>	Apramycin-Resistenzgen-Kassette
Apr ^R	Apramycin-Resistenz
BHI	Herz-Hirn-Infusion (engl. <i>Brain Heart Infusion</i>)
BSA	Bovines Serum-Albumin
bp	Basenpaar
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Resistenzgen-Kassette
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMPD	Dimethylphenylendiamin
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E ₀ '	Standard-Redoxpotential mit T = 295,15 K und pH = 7.0
F	Farad
Fdh	Formiat-Dehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hfb	hinterer flankierender Bereich
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. <i>Horse Raddish Peroxidase</i>)
ISC	<i>Iron-Sulfur-Cluster</i> (Gencluster Fe-S-Reifender Proteine)
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
<i>kan</i>	Kanamycin-Resistenzgen-Kassette
kDa	Kilodalton
Km ^R	Kanamycin-Resistenz
LB	<i>Lysogeny Broth</i>

M	molar (mol/L)
MBP	Maltosebindeprotein
Mcc	Octahäm Cytochrom <i>c</i> -Sulfitreduktase
MCS	<i>Multiple Kloning Site</i>
MK	Menachinon-6
MKH₂	Menachinol-6
MK7	Menachinon-7
MMK	8-Methylmenachinon-6
Na-EDTA	Natrium-Ethylendiamintetraacetat
OD_x	Optische Dichte bei x nm
Ori	Replikationsursprung (engl. <i>Origin of Replication</i>)
P_x	Promotor stromaufwärts des Gen(clusters) x
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
rcf	Umdrehungen pro min (engl. <i>rounds per minute</i>)
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
Spekt^R	Spektinomycin-Resistenz
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer (engl. <i>Tris-acetate-EDTA buffer</i>)
TB	<i>Terrific Broth</i>
Tetrakis(Acetonitril)Cu(I) Hexafluorophosphat ([(CH₃CN)₄Cu(I)] PF₆)	TACH
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
vfB	vorderer flankierender Bereich
w/v	Gewichtsprozent (engl. <i>weight per volume</i>)
β-ME	β-Mercaptoethanol

3. ZUSAMMENFASSUNG

Sulfit bzw. Hydrogensulfit ist ein wichtiges Zwischenprodukt des Schwefelkreislaufs, als reaktive Schwefelverbindung aber auch ein Toxin. Das Epsilonproteobakterium *Wolinella succinogenes* verwendet für die Sulfit-Atmung und -Detoxifizierung die Oktahäm-Cytochrom *c*-Sulfit-Reduktase MccA, welche im *mcc*-Gencluster kodiert ist. Stromaufwärts von *mccA* sind die Gene des hypothetischen Zweikomponentensystems *mccR* und *-S* lokalisiert. Stromabwärts von *mccA* liegen Gene, deren Produkte an der putativen Elektronentransportkette vom Chinonpool zu MccA beteiligt sein dürften (*mccC* und *-D*), solche für die Reifung von MccA (*mccB*, *ccsA1* und *mccl*) und solche mit unbekannter Funktion (*mccE* und *-F*). Für den Elektronentransport zwischen respiratorischen Komplexen verwendet *W. succinogenes* Menachinon (MK) und dessen Derivat 8-Methylmenachinon (8-MMK), wobei letzteres aufgrund des negativeren Redoxpotentials des 8-MMK/8-MMKH₂-Paares für die Sulfitatmung thermodynamisch günstiger ist.

In dieser Arbeit wurde durch Leseraster-Mutation der Leserahmen von *mccR* in der Mutante *W. succinogenes mccR⁺ cat* verlängert, was im Gegensatz zum Wildstamm die gleichzeitige Atmung von Sulfit und Fumarat erlaubte. Derivate von *W. succinogenes mccR⁺ cat* mit einzelnen nichtpolaren Gendelektionen zeigten, dass *mccB*, *-C* und *-D* für die Sulfitatmung essenziell waren, während Zellen ohne *mccl* oder 8-MMK Sulfit mit verringerter Aktivität reduzierten. Die simultane Deletion von *mccE* und *-F* hatte dagegen keinen Einfluss auf die Sulfitatmung.

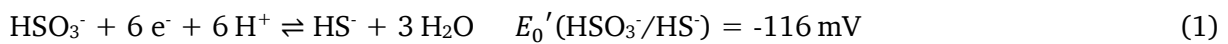
Eine Streptag-markierte Variante von MccA wurde unter der Kontrolle des *mcc*-Promotors in *W. succinogenes* produziert und gereinigt. Dessen Varianten, bei welchen eines der beiden Cu(I)-bindenden Cysteine durch Alanin ausgetauscht wurde, zeigten zwar dieselben spektroskopische Eigenschaften wie Wildstamm-MccA, waren zur Sulfitreduktion aber nicht in der Lage und enthielten kein Cu(I). Wildstamm-MccA wurde durch hohe Nitritkonzentrationen gehemmt, wohingegen das Cu(I)-lose MccA_C399A-twS keine Substratinhibierung zeigte. Das Eisen-Schwefel-Protein MccC wurde heterolog in *Escherichia coli* produziert. Da es nur einen Teil der erwarteten [4Fe4S]-Zentren enthielt, wurde es anschließend *in vitro* rekonstituiert. Mccl wurde sowohl in *W. succinogenes* als auch in *E. coli* produziert, gereinigt und der Kupfergehalt bestimmt. Durch *in vitro*-Rekonstitution war das Protein zusätzlich mit Cu(I) beladbar. Schließlich wurden MccA-Homologe und *mcc*-Gencluster in Beta-, Gamma- und Deltaproteobakterien identifiziert und die Diversität der *mcc*-Gencluster untersucht.

Insgesamt wurden die Cytochrom *c*-Sulfitreduktasen im bisher nicht erreichtem Detail untersucht und die Aufgaben der beteiligten Komponenten beleuchtet.

4. EINLEITUNG

4.1. Sulfitreduktion und der biogeochemische Schwefelkreislauf

Sulfit bzw. Hydrogensulfit (SO_3^{2-} bzw. HSO_3^-) ist ein zentrales Intermediat des biogeochemischen Schwefelkreislaufes [1][2] (Abbildung 1). Zum einen ist es ein Zwischenprodukt bei der Umwandlung von Sulfat zu Sulfid (dissimilatorische Sulfat-Reduktion) oder organischen Schwefelspezies (assimilatorische Sulfat-Reduktion). Zum anderen aber auch ein Toxin, welches seine Giftigkeit durch Reaktion mit reaktiven Gruppen von Proteinen oder Nukleinbasen zu Sulfonsäure-Addukten entfaltet und daher rasch metabolisiert werden muss [3]. Durch dissimilatorische Sulfitreduktion bzw. Sulfitatmung, wird das gut lösliche Sulfit zu Sulfid oder Hydrogensulfid (S^{2-} bzw. HS^-) reduziert (Gleichung (1), der Einfachheit halber werden im Folgenden HS^- und S^{2-} als Sulfid zusammengefasst).



Sulfid steht im Gleichgewicht mit dem flüchtigen Schwefelwasserstoff (H_2S) oder bildet mit gelösten Metallkationen schwer lösliche Verbindungen, was die Toxizität von Sulfid gegenüber Sulfit für den Organismus verringert. Die 6-Elektronen-Reduktion von Sulfit (Oxidationszustand des Schwefels +IV) zu Sulfid (Oxidationszustand des Schwefels -II) wird durch dissimilatorische Sulfitreduktasen katalysiert. Im Laufe der Evolution haben sich für die Sulfitatmung verschiedene Arten von dissimilatorischen Sulfitreduktasen entwickelt.

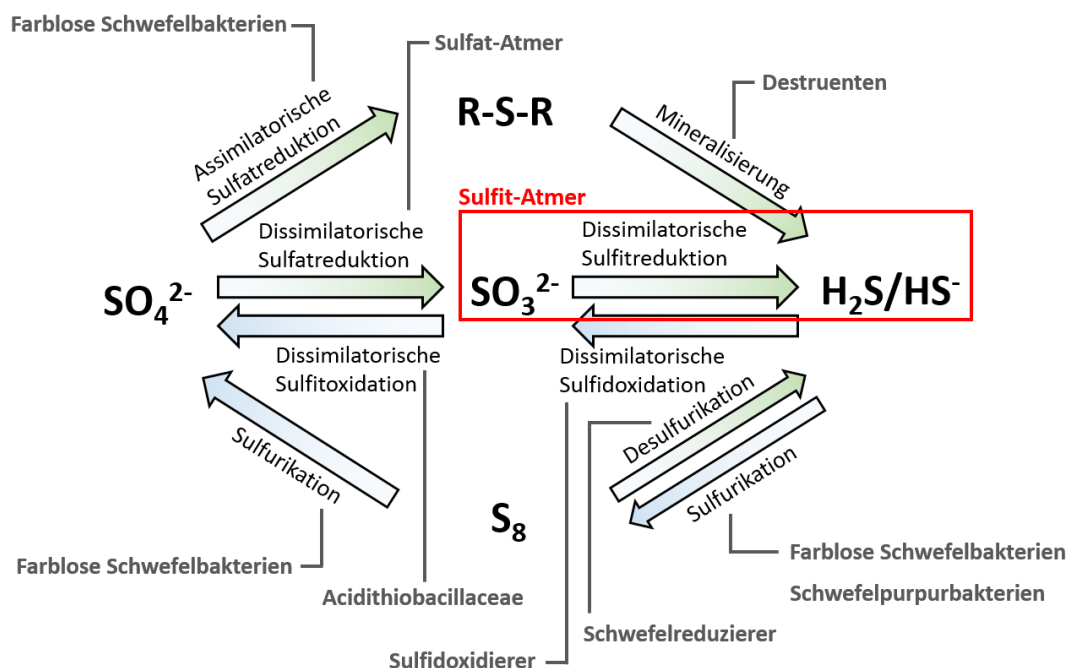


Abbildung 1. Überblick über den biogeochemischen Schwefelkreislauf. Der Schritt der dissimilatorischen Sulfitreduktion ist hervorgehoben. **R-S-R:** in organischen Molekülen oder Eisen-Schwefel-Zentren gebundener Schwefel. [**S**]: Elementarer Schwefel, ringförmig mit beispielsweise 8 Gliedern oder als Bestandteil von Polysulfiden. Verändert nach [1][2].

4.2. Mikrobielle Dissimilatorische Sulfitreduktasen

Dissimilatorische Sulfitreduktasen dienen im Zusammenspiel mit einer elektrogenen Dehydrogenase der ATP-Bildung durch Aufbau eines Protonengradienten zwischen dem Cyto- und dem Periplasma, zum anderen auch der Entfernung des giftigen Sulfits. Die für die Reduktion benötigten Elektronen werden dabei von dem Enzymkomplex, der einen korrespondierenden Elektronendonator oxidiert, auf in der Membran liegendes Menachinon übertragen. Das so erzeugte Menachinol wird im Folgenden von der Multikomponenten-Sulfitreduktase oxidiert und so die Elektronen für die Sulfitreduktion zur Verfügung gestellt. Bisher sind in Prokaryoten zwei Arten von dissimilatorischen Sulfitreduktasen bekannt. Zum einen gibt es das Dsr-System, welches von Organismen, die sowohl zur Sulfat- als auch Sulfitatmung fähig sind, genutzt wird. Zum anderen existiert das sogenannten Mcc-System, wobei die Organismen, welche dieses besitzen, zur Sulfit-, nicht aber zur Sulfatatmung in der Lage sind.

4.2.1. Dsr-Sulfitreduktasen

In Sulfat-atmenden Bakterien und Archaeen katalysiert der Dsr-Komplex die Sulfitreduktion. Sulfitreduktasen vom Dsr-Typ wurden beispielsweise in *Desulfovibrio gigas* und *Archaeoglobus fulgidus* untersucht [4][5]. Die Kristallstruktur des Dsr-Komplexes wurde sowohl als Heterotetramer (DsrAB)₂ von *Archaeoglobus fulgidus* als auch als Heterohexamer (DsrABC)₂ von *Desulfovibrio vulgaris* gelöst [6][7]. DsrA besitzt im aktiven Zentrum als Kofaktor ein Sirohydrochlorin und DsrB ein Sirohäm, welche beide über einen Cystein-Rest an ein [4Fe4S]-Zentrum gebunden sind. Nach aktuellem Wissensstand wird durch den DsrAB-Komplex das Sulfit mit 4 Elektronen bis zum S⁰ reduziert und von DsrC unter Bildung eines Heterotrisulfids gebunden (Abbildung 2). Das von den Cysteinen gebundene Schwefelatom wird im Folgenden mit 2 Elektronen pro Proteintrisulfid zu Sulfid reduziert, wonach DsrC erneut zur Schwefelbindung in der Lage ist [8]. Nach dem aktuellen Modell liefert bei der Dsr-katalysierten Sulfitreduktion der membranständige DsrMKJOP-Komplex die nötigen Elektronen aus dem Menachinon-Pool [9][10].

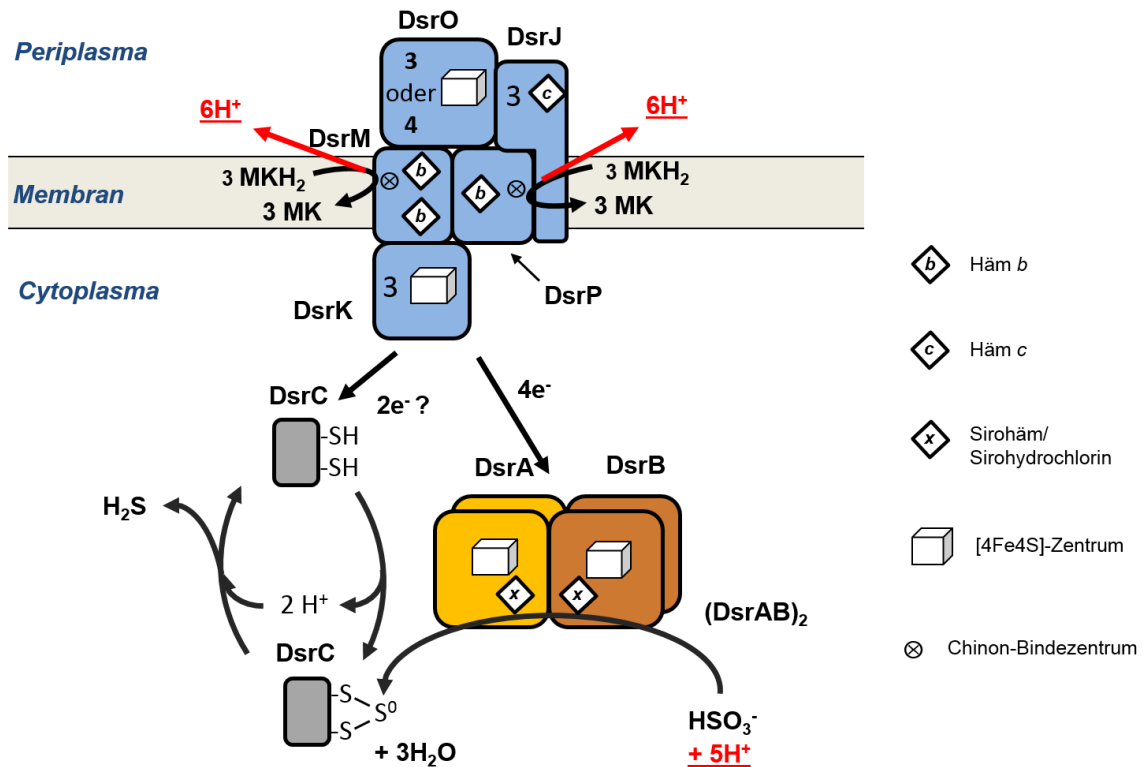


Abbildung 2. Überblick und vorgeschlagener Mechanismus der Sulfidreduktion durch das Dsr-System. Das Substrat Sulfit wird cytoplasmatisch durch DsrAB bis zu S⁰ reduziert (vier Elektronen) und im Folgenden von DsrC als Heterotrissulfid gebunden. Anschließend erfolgt die Reduktion des Protein-Trissulfids, hypothetisch von DsrK (zwei Elektronen). Die Sulfidreduktion ist an die MKH₂-Oxidation durch DsrM und/oder DsrP gekoppelt. Verändert nach [2] und [10]. Protonen, welche zum Aufbau eines Protonengradienten beitragen, sind rot und unterstrichen.

4.2.2. Mcc-Sulfidreduktasen

Verschiedene Bakterien, welche nicht zur Sulfatatmung, aber dennoch zur Sulfidatmung in der Lage sind, verwenden für die Sulfidreduktion das sogenannte Mcc-System. Dessen zentrales Enzym MccA ist ein Octahäm-Cytochrom c, was dessen Namensgebung diente (*multiheme cytochrome c A*). MccA besitzt einige für Multihäm-Cytochrome c ungewöhnliche Eigenschaften (Abbildung 3). 7 der 8 Häm c-Gruppen sind an ein kanonisches CX₂CH-Motiv (Cystein, zwei beliebige Aminosäuren, Cystein und Histidin) gebunden, die achte Häm-Gruppe wird hingegen an einem unkonventionellen CX₁₅CH-Motiv vorgefunden [11][12]. Darüber hinaus befindet sich die Peptidbindung zwischen den Aminosäure-Resten G508 und F509 in einer nicht spontan auftretenden *cis*-Konformation [11]. Diese Peptidbindung liegt in einer Schleife räumlich nahe des CX₁₅CH-Motivs. Daher wird angenommen, dass die *cis*-Konformation wichtig für die korrekte Konformation des CX₁₅CH-Motivs und somit für die Funktion von MccA sicherstellt

[11–15]. Im aktiven Zentrum von MccA liegt ein Cu(I)-Kation gebunden vor. Dieses befindet sich 4,4 Å vom katalytisch aktiven Häm *c*-gebundenen Eisen entfernt [11]. MccA, welches unter Sauerstoff-Exposition gereinigt und gelagert wurde, besaß einen signifikant geringeren Anteil an Cu(I) pro Monomer als anaerob gereinigtes [11]. Der Vergleich der katalytischen Aktivität abhängig von der Kupferbeladung der aerob gereinigten (0,2 bis 0,5 Cu pro Monomer und $k_{\text{cat}} = 99,5 \text{ s}^{-1}$) und der anaerob gereinigten Variante (0,7 bis 1,0 Cu pro Monomer und $k_{\text{cat}} = 200,6 \text{ s}^{-1}$) deutet auf eine lineare Korrelation der Kupferbeladung mit der enzymatischen Aktivität hin, sodass Cu(I) einen für die Sulfitreduktion notwendigen Kofaktor darstellt [11]. Der Kupfergehalt von aerob gereinigtem MccA konnte nicht *in vitro* mittels Cu(I)-Spezies erhöht werden. Daher wird angenommen, dass die Beladung über ein Chaperon katalysiert wird und möglicherweise vor der Bindung der Häm *c*-Gruppen stattfindet. Hypothetisch wird durch die Elektronendichte von Cu(I) nahe des katalytisch aktiven Häm *c* die Bindung des Sulfit-Anhydrids SO₂ stark begünstigt [11]. Während Sulfit mit hoher Affinität bindet, aber nicht reduziert werden kann (Selbstmordsubstrat), dient dieser Hypothese nach SO₂ als das eigentliche Substrat der Reduktion. Die Sulfitreduktion mithilfe eines solchen Mcc-Systems wurde bisher bei dem Gammaproteobakterium *Shewanella oneidensis* MR-1 [16] sowie bei dem Epsilonproteobakterium *Wolinella succinogenes* beobachtet [12].

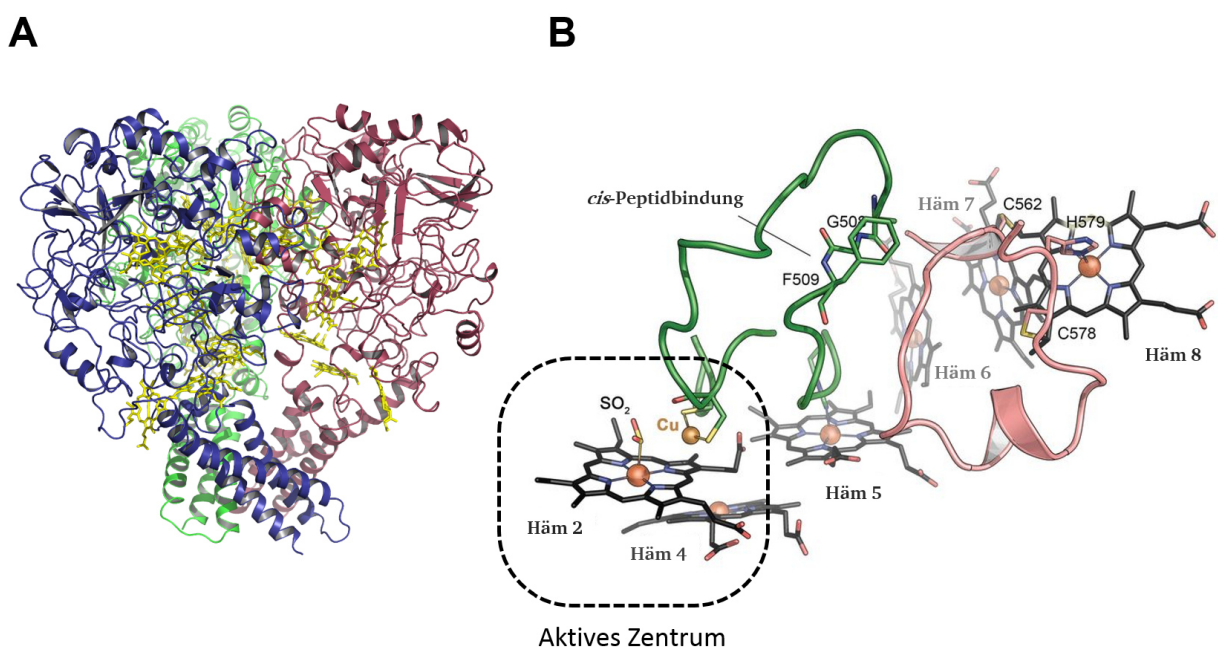


Abbildung 3. Struktur und unkonventionelle Merkmale von *W. succinogenes* MccA. **A:** Quartärstruktur von trimerem MccA. Zur Unterscheidung ist jede Peptidkette anders eingefärbt. **B:** Das aktive Zentrum, das Cu(I) und die dieses bindenden Cysteine sowie die katalytisch aktive Häm-Gruppe (Häm 2) wurde zur besseren Übersicht eingerahmt. Die CX₁₅CH-Motiv beinhaltende Schleife ist rot, die räumlich benachbarte Schleife mit der *cis*-Peptidbindung zwischen G508 und F509 grün gefärbt. Verändert nach [11].

4.3. *Wolinella succinogenes* als Modellorganismus

W. succinogenes zählt zu den Epsilonproteobakterien (oder Campylobacterota [17][18]), dessen nächsten Verwandte die Gattungen *Campylobacter* und *Helicobacter*, welche humanpathogene Vertreter enthalten, aber auch ökologisch wichtige Vertreter aus den Gattungen *Sulfurospirillum* sind, welche in syntrophen Gemeinschaften leben [19]. *W. succinogenes* lebt als Kommensale im Rinderpansen und wurde erstmals 1961 hieraus isoliert [20]. Wie viele andere Epsilonproteobakterien ist *W. succinogenes* nicht zur Fermentation fähig und regeneriert ATP nur über Respiration. Als Elektronendonoren können Wasserstoff oder Formiat dienen. *W. succinogenes* ist in der Lage, verschiedenste Elektronenakzeptoren zu reduzieren, von solchen mit niedrigem Redoxpotential wie das Redoxpaar Polysulfid/Sulfid ($E_0'(\text{HS}_4^-/\text{HS}^-) \approx -260 \text{ mV}$) bis zu solchen mit hohem Redoxpotential wie das $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ -Paar ($E_0'(\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2) = +1433 \text{ mV}$) [21][22]. Für den Elektronentransport innerhalb der Membran wird Menachinon-6 (im Folgenden als MK abgekürzt) oder das durch die Klasse C rSAM-Methyltransferase MqnK aus MK synthetisierte 8-Methylmenachinon-6 (im Folgenden als 8-MMK abgekürzt) verwendet [23]. Methylierte Derivate von Menachinonen besitzen aufgrund des induktiven Effektes ein negativeres Redoxpotential des Paares der oxidierten und reduzierten Spezies [24][25]. Da das Redoxpotential $E_0'(\text{MK}/\text{MKH}_2) = -75 \text{ mV}$ positiver ist als $E_0'(\text{HSO}_3^-/\text{HS}^-) = -116 \text{ mV}$, ist bei Reduktion von Sulfit mittels MKH_2 bei Nichtbeachtung der Konzentration endergon. Im Gegensatz hierzu wäre, da $E_0'(8\text{-MMK}/8\text{-MMKH}_2) \approx -150 \text{ mV}$ negativer ist als das Redoxpotential des Sulfit/Sulfid-Paares, die Sulfitreduktion mittels 8-MMKH_2 exergon. *W. succinogenes* eignet sich aufgrund der Versatilität der terminalen Elektronenakzeptoren, des Fehlens von Gärung und der Nutzung von zwei Chinonen mit unterschiedlichem Redoxpotential als Modellorganismus für die Aufklärung der Kopplungsmechanismen der anaeroben Atmung.

4.4. Der *mcc*-Gencluster von *Wolinella succinogenes*

Die *mcc*-Gene liegen im Genom von *W. succinogenes* DSM 1740, fortan als Wildstamm bezeichnet, in einem 10 Gene einschließenden Gencluster vor (Abbildung 4).

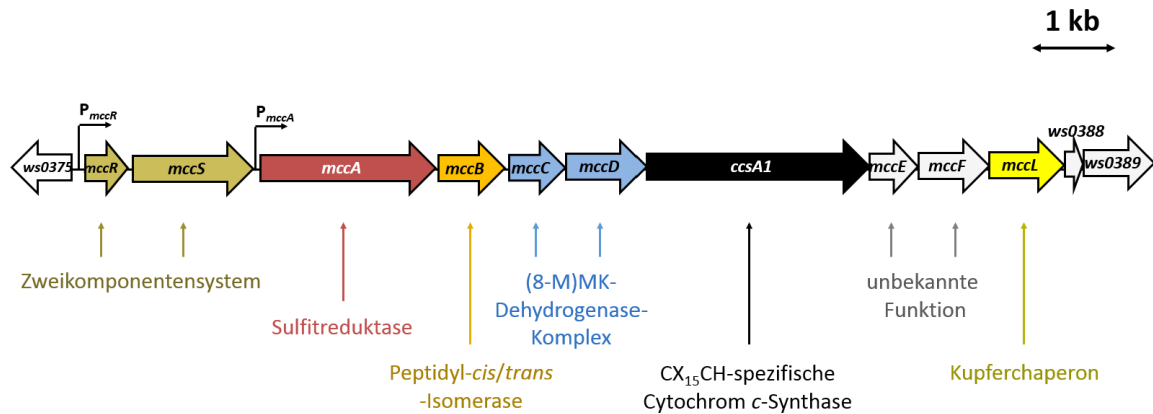


Abbildung 4. Der in *W. succinogenes* DSM 1740 (Wildstamm) vorgefundene *mcc*-Gencluster. Gezeigte oder vorhergesagte Funktionen der Genprodukte sind darunter annotiert. P_{mccR}/P_{mccA} bezeichnen die stromaufwärts von *mccR* bzw. *mccA* liegenden Promotor-Elemente. Zur Orientierung wurden die stromaufwärts und stromabwärts des *mcc*-Genclusters liegenden Gene *ws0375* und *ws0388* eingezeichnet.

Die Gene *mccR* und *mccS*, welche sich stromaufwärts der Gene für die Sulfitreduktase unter einem eigenen Promotor befinden, kodieren für ein Zwei-Komponenten-System mit der Histidin-Kinase MccS (BaeS-Superfamilie) und dem Transkriptionsfaktor MccR (REC-Superfamilie). Das Gen *mccA* stromabwärts von *mccS* kodiert abhängig vom stromaufwärts gelegenen *mccA*-Promotor für die Sulfitreduktase. Das Genprodukt von *mccB* ist eine hypothetische Peptidyl-*cis/trans*-Isomerase, welche für die Konformationsänderung der oben beschriebenen Peptidbindung zwischen G508 und F509 von MccA zuständig sein könnte. Stromabwärts von *mccB* liegen die beiden Gene *mccC* und *-D*, wobei *mccC* für ein vier [4Fe4S]-Zentren enthaltene Protein der PsrB-Familie und *mccD* für eine membranständige Menachinoldehydrogenase aus der PsrC-Familie kodiert. Hypothetisch könnte sich ein transienter Komplex aus MccA und MccCD bilden, welcher die Menachinol-Oxidation an die Sulfitreduktion koppelt (Abbildung 5). Das Gen *ccsA1* kodiert für die für die Reifung des CX₁₅CH-Motivs notwendige Cytochrom *c*-Synthase [13]. Für die Reifung von Cytochromen *c* kodieren die Genome von Epsilonproteobakterien das Cytochrom *c* Synthese System II mit den Transmembranproteinen CcsB und CcsA, welche in *W. succinogenes* als Fusionsprotein CcsBA vorkommen [15][26]. Das Genprodukt von *ccsA1* scheint ein solches Fusionsprotein speziell für die Reifung von MccA zu sein, da ohne *ccsA1* kein MccA produziert wird [13]. Es wird als essenziell für die Bindung von Häm *b* an das CX₁₅CH-Motiv angesehen. Das Genprodukt von

mccL ist hypothetisch das Kupferchaperon, welches Cu(I) an das aktive Zentrum von *MccA* liefert [12]. Es gehört zur NosL-Superfamilie, deren Vertreter ein konserviertes und potenziell Cu(I)-bindendes CXXCXM-Motiv besitzen. Im Gegensatz zu anderen Vertretern der NosL-Superfamilie verfügt *MccL* über zwei dieser Cu(I)-Bindemotive. Während der Formiatdehydrogenase-abhängigen Sulfitreduktion ist der Fdh-Komplex die elektrogene Komponente (Abbildung 5). Da die während der Oxidation von MKH₂ oder 8-MMKH₂ die in das Periplasma freigesetzten Protonen durch die Sulfitreduktion wieder gebunden werden, ist die durch das *Mcc*-System katalysierte Reaktion elektroneutral. Das maximale Verhältnis in das Periplasma übertragener Protonen zu von Formiat zu Sulfit übertragenen Elektronen wird wie folgt berechnet.

$$\left(\frac{H^+}{e^-}\right) \triangleq \frac{E_0'(HSO_3^-/HS^-) - E_0'(CO_2/HCOO^-)}{\Delta p} = \frac{316 \text{ mV}}{150 \text{ mV}} = 2,11 \quad (2)$$

Hierbei steht Δp für das bei Bakterien zu elektrochemische Protonenpotential, welches als ungefähr 150 mV (vom Periplasma zum Cytoplasma) bestimmt wurde [27].

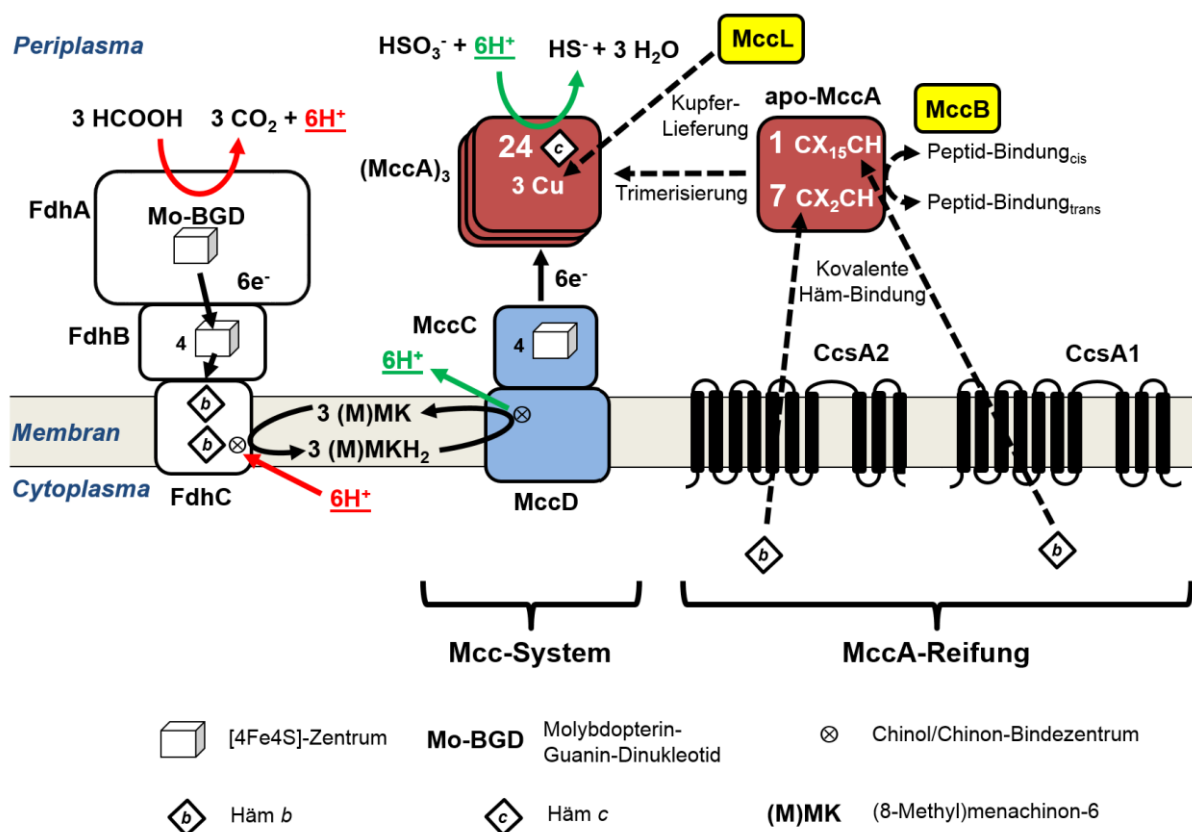


Abbildung 5. Modell der elektrogenen *W. succinogenes* Elektronentransportkette zwischen dem Formiat-Dehydrogenasekomplex FdhABC und dem *Mcc*-Sulfitreduktase-System *MccACD*. Reifes *MccA* ist in der nativen trimeren Form gezeigt. Der Weg der Elektronen von FdhABC über Menachinon oder 8-Methylmenachinon auf *MccCD* ist durch durchgezogene Pfeile schematisiert. Die für die Reifung von *MccA* zuständigen Proteine sind rechts neben *MccA* abgebildet und deren jeweilige Aufgabe durch gestrichelte Pfeile angezeigt [10][11][25]. Elektroneutrale Schritte sind grün, elektrogene Schritte rot annotiert. Verändert nach [2] und [28].

Zur Charakterisierung der Genprodukte des *mcc*-Genclusters wurde in der Mutante *W. succinogenes* $P_{frd} \text{ } mcc \text{ } cat$ dieser unter dem Fumaratreduktase-Promotor induziert [11][12]. Kulturen wuchsen mit Fumarat als Elektronenakzeptor auf eine genügend hohe optische Dichte, um MccA zu reinigen und dessen Kristallstruktur zu lösen. Kulturen von Deletionsmutanten von *mccB*, *-C*, *-D* und *ccsA1* konnten ebenfalls auf eine genügend hohe optische Dichte angezogen werden, um die Sulfitreduktion mithilfe von Zellsuspensionen zu charakterisieren [11][12]. Bei Deletion von *mccB* und *ccsA1* war MccA in den ersten Stunden nach Induktion in geringer Konzentration nachweisbar, das Enzym schien aber im Folgenden abgebaut zu werden, wodurch geschlossen wurde, dass MccA ohne die Reifung von MccB oder CcsA1 instabil vorliegt und von Proteasen verdaut wird. Ohne *mccC* oder *mccD* war keine Sulfitreduktion trotz Vorhandenseins von reifem MccA möglich. Mutanten ohne die Gene *mccE* und *-F* zeigten keine Beeinträchtigung der Sulfitreduktaseaktivität.

4.5. Regulation der *mcc*-Genexpression

Innerhalb der Sensordomäne von *W. succinogenes* MccS wurde ein konserviertes Häm c-Bindemotiv, welches bei den *mccS*-Homologen konserviert ist (Abbildung 6) identifiziert.

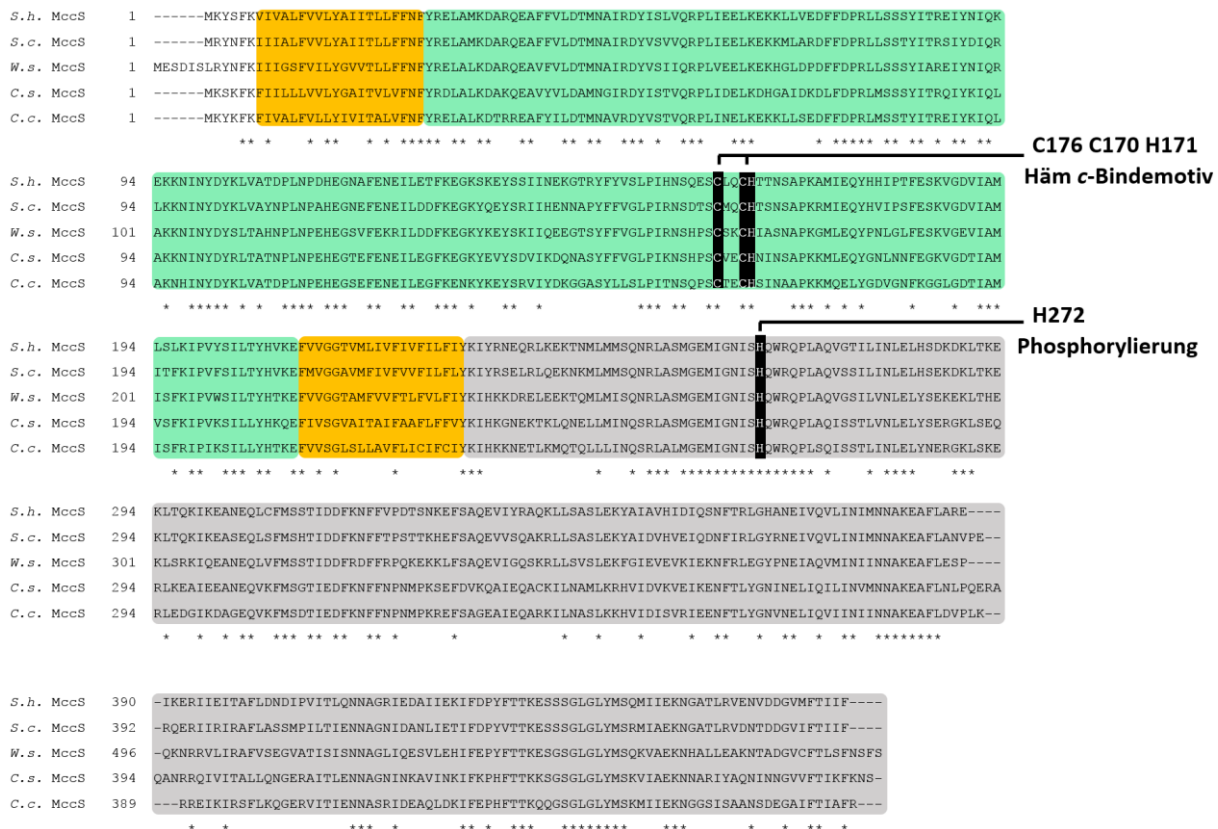


Abbildung 6. Vergleich der vorausgesagten Primärstrukturen von ausgewählten MccS-Orthologen in *mcc*-Genclustern und vorausgesagte Topologie von *W. succinogenes* MccS. Konservierte Aminosäuren sind durch Sterne annotiert. Die den unterschiedlichen Domänen zugeordnete Bereiche wurden farblich wie folgt unterlegt: Gelb: Transmembran-Domäne, grün: extrazelluläre Sensordomäne, grau: intrazelluläre Histidinkinase-Domäne. Das konservierte Häm c-Bindemotiv sowie das katalytisch aktive Histidin schwarz markiert. *S.h.*: *Sulfurospirillum halorespirans* (WP_069478922.1), *S.c.*: *Sulfurospirillum cavolei* (WP_041962496.1), *W.s.*: *Wolinella succinogenes* (WP_041571975.1), *C.s.*: *Campylobacter showae* (WP_122872995.1), *C.c.*: *Campylobacter concisus* (WP_103573377.1). Die Transmembran-Helizes wurden mit TMHMM 2.0 vorausgesagt.

Es wird angenommen, dass Sulfit oder SO₂ an der Häm c-Gruppe von MccS bindet [12]. Hierdurch könnte durch Verschiebung der mit der Kinase-Domäne verbundenen Transmembranhelix MccS in eine aktive Konformation überführt werden. Das Gen *mccR* von *W. succinogenes* kodiert für einen Antwortregulator mit 170 Aminosäureresten, welcher über eine N-terminale Dimerisierungs-Domäne mit einem konservierten Aspartat-Rest als Phospho-Akzeptor verfügt. MccR-Orthologe hingegen besitzen 229 Aminosäure-Reste und eine zusätzliche, C-terminale DNA-Bindedomäne (Abbildung 7). Durch Deletion eines Desoxyadenosin-Monophosphat-Adenosins an Position 492 würde der Leserahmen vom *W. succinogenes* MccR verlängert werden und ebenfalls eine C-terminale DNA-bindende Domäne

besitzen. Es war daher zu vermuten, dass das von *W. succinogenes* DSM 1740 kodierte MccR inaktiv ist.

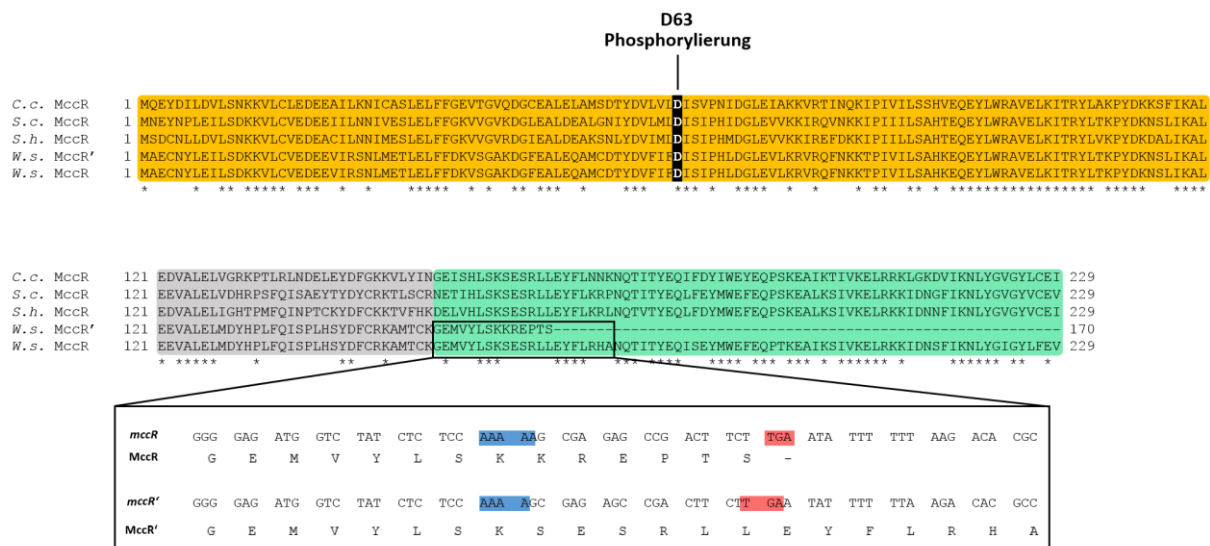


Abbildung 7. Vergleich von *W. succinogenes* MccR mit Orthologen aus anderen Epsilonproteobakterien. Die vorausgesagten Domänen des Proteins sind farblich wie folgt hervorgehoben: gelb: Dimerisierungsdomäne, grau: überbrückende Domäne, grün: DNA-bindende Domäne. Mittig wurden die Aminosäuresequenzen der Proteine verglichen. Das trunkierte MccR des *W. succinogenes*-Wildstammes wird MccR' genannt. Konservierte Reste sind mit Sternchen annotiert. Unten wurde der Bereich der Gene von *mccR'* und *mccR* von *W. succinogenes*, in welchem die Leserastermutation lokalisiert ist, hervorgehoben. Die Desoxyadenosin-Monophosphat-Nukleotid-Sequenz mit der vorausgesagten Leserastermutation in *W. succinogenes* *mccR'* wurde blau, das resultierende Opal-Stopcodon rot markiert. *S.h.*: *Sulfurospirillum halorespirans* (WP_069478922.1), *S.c.*: *Sulfurospirillum cavolei* (WP_041962496.1), *W.s.*: *Wolinella succinogenes* (WP_041571975.1), *C.s.*: *Campylobacter showae* (WP_122872995.1), *C.c.*: *Campylobacter concisus*

Lag im Medium neben Sulfit zusätzlich der Elektronenakzeptor Fumarat oder Nitrat vor, so begann *W. succinogenes* erst mit der Sulfit-Atmung, nachdem der andere Elektronenakzeptor verbraucht war. Während andere Elektronenakzeptoren wie Fumarat oder Nitrat innerhalb weniger Stunden nach Inokulierung des Mediums umgesetzt wurden [27], begann *W. succinogenes* erst 18 h nach Inokulierung oder Verbrauch aller anderer Elektronenakzeptoren mit der Sulfitatmung [12]. Zellen wuchsen unter Sulfitatmung auf eine optische Dichte von etwa 0,2, was den Erhalt von größeren Mengen an Zellmasse erschwerte. Es wurde vermutet, dass die verzögerte Produktion der Mcc-Proteine durch das verkürzte MccR gegeben war. Hypothetisch könnten Zellen, dessen MccR die zusätzliche C-terminale DNA-Bindedomäne besitzt (Abbildung 7, unterste Reihe der verglichenen MccR-Homologe), den *mcc*-Gencluster unmittelbar nach Kontakt mit Sulfit oder auch bei Vorhandensein von Sulfit und weiteren Elektronenakzeptoren induzieren.

4.6. Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion der für die Sulfitreduktion wichtigen Proteine in *W. succinogenes* demonstriert werden. Im Gegensatz zu vorangegangenen Arbeiten mit *W. succinogenes* $P_{frd} mcc\ cat$ sollten nun die *mcc*-Gene unter der Kontrolle des *mcc*-Promotors und somit abhängig von Sulfit exprimiert werden. Ziel war es, zunächst durch Leseraster-Mutation eine Mutante mit einem am 3'-Ende veränderten *mccR* zu erstellen. Es sollte untersucht werden, ob diese Mutante unmittelbar nach Inokulierung in Sulfit-supplementiertem Medium mit der Sulfitatmung beginnt und hierzu auch bei gleichzeitiger Supplementierung von Sulfit und Fumarat in der Lage ist. Durch nichtpolare Deletion von *mccB*, *-C*, *-D* oder *-L* sowie gleichzeitiger Deletion von *mccE* und *-F* sollte dessen Notwendigkeit für die Sulfitatmung bestimmt werden. Auch die Wichtigkeit des Elektronen-transportierenden 8-MMK sollte durch Deletion des Gens des 8-MMK-synthetisierenden Enzyms MqnK untersucht werden. Die Sulfitreduktase MccA, das Elektronentransport-Protein MccC sowie das Kupferchaperon MccL sollten entweder in *W. succinogenes* oder in *Escherichia coli* produziert und gereinigt werden. Anschließend sollte anhand der optischen Eigenschaften von MccA und MccC auf das Vorhandensein von Kofaktoren geschlossen und die Beladung von MccA, MccC und MccL mit den jeweiligen Kofaktoren quantifiziert werden. Es sollten ausgewählte konservierte Aminosäure-Reste ausgetauscht und deren Wichtigkeit für die Bindung dieser Kofaktoren herausgefunden werden. Es sollte die Notwendigkeit der Reste C399 und C495 in MccA für die Cu(I)-Bindung untersucht werden. Schließlich sollten MccA-Homologe in einen phylogenetischen Kontext zueinander gebracht und anhand der *mccA*-Gene *mcc*-Gencluster, sofern vorhanden, identifiziert werden. Die in diesen Genclustern kodierten MccA-Proteine sollten ebenfalls verglichen werden und es sollte überprüft werden, inwiefern deren Verteilung auf die unterschiedlichen Gencluster das Verwandtschaftsverhältnis der MccA-Proteine widerspiegelt. Zusammengefasst sollte das Mcc-Sulfitreduktase-System in bisher nicht dagewesener Detailliertheit untersucht und charakterisiert werden. Durch die phylogenetische Einordnung der MccA-Proteine und der dazugehörigen Gencluster sollten Rückschlüsse auf mögliche ökologische Rollen dieses Genclusters in der Sulfitreduktion und im Schwefelkreislauf gezogen werden.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1. In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und deren Vertreiber.

Substanz	Vertreiber
Acetonitril HPLC grade	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumeisen(III)citrat	Sigma-Aldrich (heute Merck), Taufkirchen
Ammoniumeisen(II)sulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Merck, Darmstadt
Apramycinsulfat	Merck, Darmstadt
Acrylamid-Lösung 30 % (w/v)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich (heute Merck), Taufkirchen
Anhydrotetracyclin	IBA Lifesciences, Göttingen
Ammoniumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat Roth	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan	Applichem, Darmstadt
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	Carl Roth, Karlsruhe
Cobaltchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
<i>d</i> -Desthiobiotin	IBA Lifesciences, Göttingen
Dianisidin*2HCl	Merck, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat	VWR, Darmstadt
Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe
Eisen(II)chlorid Tetrahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Eisen(III)chlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 70 % (v/v) vergällt	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 99,8 % (v/v) unvergällt	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Natrium-Ethylendiamintetraacetat	Merck, Darmstadt
Fuchsin basisch	Carl Roth, Karlsruhe
Fumarsäure	Merck, Darmstadt
Glutaminsäure	Merck, Darmstadt

Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid	IBA Lifesciences, Göttingen
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumcyanid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Kobaltchlorid Hexahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Kupferchlorid Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Manganchlorid Tetrahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
<i>d</i> -Maltose Monohydrat	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin	Merck, Darmstadt
NAD ⁺	Roche, Basel
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich (heute Merck), Taufkirchen
Natriumdithionit	Sigma-Aldrich (heute Merck), Taufkirchen
Natriumformiat	Fluka Analytical (Sigma-Aldrich), Taufkirchen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriummolybdat Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumsulfid	Merck, Darmstadt
Natriumsulfit	VWR, Darmstadt
Nickelchlorid Hexahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Saccharose	Sigma-Aldrich (heute Merck), Taufkirchen
Spektrinomycin Dihydrochlorid	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Tris (basisch)	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30 % (w/v)	VWR, Darmstadt
Zinkacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Zinkchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
4-Chloro-1-naphthol	Sigma-Aldrich (heute Merck), Taufkirchen

Tabelle 2. In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien und Enzyme sowie deren Vertreter.

Verbrauchsmaterial	Vertreiber
Anti-MBP Monoclonal Antibody, HRP conjugated	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Albumin Fraktion IV biotinfrei	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Brain Heart Infusion, Porcine</i>	Merck, Darmstadt
<i>Brain Heart Infusion-Agar</i>	Merck, Darmstadt
Color Prestained Protein Ladder P7712	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Color Prestained Protein Ladder P7719	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DnaseI	VWR, Darmstadt
Formiat-Dehydrogenase	Roche, Basel
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Merck, Darmstadt
GenElute™ PCR-Cleanup Kit	Sigma-Aldrich (heute Merck), Taufkirchen
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>Lysogeny Broth (Lennox)</i>	Merck, Darmstadt
<i>Lysogeny Broth-Agar (Lennox)</i>	Merck, Darmstadt
MBP-Trap HP Affinitätssäule	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
OneTaq® DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Parafilm	Bemis, Lehigh
PD-10-Säule mit Sephadex G-25 Säule	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Phusion™ High-Fidelity DNAPolymerase	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt am Main
ROTI®-Nanoquant 5X Konzentrat	Carl Roth, Karlsruhe
<i>StrepMAB-Classic, HRP conjugate</i>	IBA, Göttingen
<i>Strep-Tactin®-HRP conjugate</i>	IBA, Göttingen
<i>Strep-Tactin® Superflow® Affinitätssäule</i>	IBA, Göttingen
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Terrific Broth	Carl Roth, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Frankfurt am Main

5.2. Verwendete Plasmide und Oligonukleotide

5.2.1. Oligonukleotide

Tabelle 3. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide zur Erstellung der in Tabelle 4 genannten Rekombinations-Plasmide.

Nr	zu amplifizierendes Fragment	Sequenz	Plasmid(e)
1	lineares pASK IBA 3 Rückgrat	GGAGACCGCGGTCCCG	3, 4, 18, 31
2		CATTTTTTGCCCTCGTTATCTAG	
3	stromaufwärts von <i>mccA</i> liegender Bereich zur	CGAGGGCAAAAAATGAATCAGGCAGCGGATTGGGACTCTATATG	3, 11
4	Konstruktion von $\Delta mccA::kan$	GTTTTTCTAACGCCTGGGAAACGAATCGTG	
5	Kanamycin-Resistenzgenkassette (<i>kan</i>) zur Konstruktion von	GTTTCCAGCGCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATG	3
6	$\Delta mccA::kan$	GTGATTCTTCCAACCCACAGATCGGATC	
7	<i>mcc</i> -Promotorelement für	TGTTGGGTTGGAAGAATCACGCCCTCTTG	3
8	$\Delta mccA::kan$	CCAACAGAAAGTTTCTCTCTTTCAAACAC	
9	stromabwärts von <i>mccA</i> liegender Bereich für	AGGAGGAAACTTTCTGTGGCCTGTTTG	3
10	$\Delta mccA::kan$	ATTCGGGACCGCGTCTCCCATTTCTTCAACCTCTTTTTTGAC	
11	stromaufwärts von <i>mccB</i> liegender Bereich für <i>pkomp</i>	GATAACGAGGGCAAAAAATGCACGCAAGTCGCTTGTCG	4
12	<i>mcc</i>	TTGGATCCGATTAAGGCTCTTTTTTCATGATTCTCTG	
13	<i>kan</i> für <i>pkomp mcc</i>	GAGCCTTTAATCGGATCCAAAGCCACGTTG	4
14		GTGATTCTTCGGGGATCCCGCTGAGGTC	
15	<i>mcc</i> -Promotorelement für	CGGGATCCCCGAAGAATCACGCCCTCTTG	4
16	<i>pkomp mcc</i>	TAACGCTCATGTTTCTCTCTTTCAAACAC	
17	Bereich von <i>mccB</i> bis	AGGAGGAAACATGAGCGTTAAAAAATCTCTG	4
18	einschließlich <i>-D</i> für <i>pkomp mcc</i>	CGAACGGGACCGCGTCTCCCTATAGGGCAAAGTCTG	
19	lineares Plasmid <i>pkomp mcc</i> ohne das <i>mcc</i> -Promotorelement	AGAATCACGCCCTCTTGAAAGTAGGATCCCGAATTTCTG	5
20		TTCCAAGAGGGCGTGATTCTTCG	
21	lineares Plasmid <i>pkomp mcc</i> ohne <i>mccB</i>	ATGGAACAGGATGGCAGAAGAAGAC	6
22		GTTTCCTCTTTCAAACACTCCAGCC	
23	lineares Plasmid <i>pkomp mcc</i> ohne <i>mccC</i>	CCTGTTGTGAAAGTAGGAGTTTAGCCATG	7
24		CTTCTAGCCTTTGATGGGCTTTTTCC	
25	lineares Plasmid <i>pkomp mcc</i> ohne die ersten 423 bp von	CGGAAGCCTTTAGAGGCGATGAC	8
26	<i>mccD</i>	GGCTAAACTCCTACTTTACAAACAGG	
27	stromaufwärts von <i>mccE</i> liegender Bereich von <i>pkomp</i>	GATAACGAGGGCAAAAAATGGGGTTTGTAGAGCCTTTTG	9
28	<i>mccEF</i>	CTTACATAGGTTAGGGCTTTACATGAGG	

29	Apramycin-Resistenzgenkassette (<i>apr</i>) für die Konstruktion von	AAAGCCCTAACCTATGTAAGGTTTTACCATCTGGGATCC	9
30	pkomp <i>mccEF</i>	GAATTAATGCCTGATGGAGGGCGCCTC	
31	<i>mcc</i> -Promotorelement für	CTCCATCAGGCATTTAATTCCTTCTCTTAATATTCATTTAAC	9
32	pkomp <i>mccEF</i>	TCTTCAACATGTTTCCTCTTTCAAAC	
33	Bereich stromabwärts von <i>mccF</i>	AGGAGGAAACATGTTGAAGAAGATTTTAGGATTG	9
34	einschließlich <i>mccF</i> für pkomp <i>mccEF</i>	AATTCGGGACCGCGGTCTCCCTCCATAGACGCTCTGTTC	
35	lineares Plasmid pkomp <i>mccEF</i>	GACGAGATGCTTTGGTTCTCTTTGGG	9
36	ohne den Großteil der Leserahmen von <i>mccE</i> und <i>mccF</i>	GGATGACTATTTCAATTTAGATTCC	
37	stromaufwärts von <i>mccL</i>	GCGAATTCATATCGCTTGCAATAGTTTAGGG (<i>EcoRI</i>)	10
38	liegender Bereich für die Konstruktion von Δ <i>mccL::kan</i>	GCGGATCCTCATAAATCCTTTCTTTAGGGC (<i>BamHI</i>)	
39	<i>kan</i> für die Konstruktion von	GGGGATCCAAAGCCACGTTGTCTCAAATCTCTG (<i>BamHI</i>)	10
40	Δ <i>mccL::kan</i>	GGGGATCCCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTG (<i>BamHI</i>)	
41	stromabwärts von <i>mccL</i>	GCGGATCCGGTTTATCCGTTTTTTGG (<i>BamHI</i>)	10
42	liegender Bereich für die Konstruktion von Δ <i>mccL::kan</i>	GCAAGCTTTTGATCTCAAACCAAATTC (<i>HindIII</i>)	
43	stromaufwärts von <i>mccR</i>	CGAATTCGAGCGAGAGGGTTTGGGAGGC (<i>EcoRI</i>)	40
44	liegender Bereich für die Konstruktion von Δ <i>mccRS::kan</i>	GCTGGATCCCGATTATGGATTCCCTCTGCCTTC (<i>BamHI</i>)	1
45	<i>kan</i> für die Konstruktion von	CGTGGATCCAAAGCCACGTTGTGTCTC (<i>BamHI</i>)	1
46	Δ <i>mccRS::kan</i>	TCGGATCCCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTG (<i>BamHI</i>)	
47	stromabwärts von <i>mccR</i>	GCGGATCCGAGTGTCTCGCTGGAAAAATTTGGC (<i>BamHI</i>)	1
48	liegender Bereich für die Konstruktion von Δ <i>mccRS::kan</i>	GTCGTCGACCACTCCAGCCTGACAACATAAAGC (<i>Sall</i>)	
49	lineares Plasmid Δ <i>mccRS::kan</i>	GATTATGGATTCCCTCTGCCTTCC (<i>blunt-end-Ligation</i>)	2
50	ohne <i>kan</i>	GAGTGTCTCGCTGGAAAAATTTGG (<i>blunt-end-Ligation</i>)	
51	Fragment <i>mccRS</i> für die Ligation	ATGGCTGAATGCAATTATTTGGAA (<i>blunt-end-Ligation</i>)	2
52	in Δ <i>mccRS</i>	AAAAGTCTTTTGGATTGTCCAATCAC (<i>blunt-end-Ligation</i>)	
53	lineares Plasmid pkomp <i>mccRS</i>	GATTATGGATCCCTCTGCCTTCC (<i>BamHI</i>)	2
54	für die Erstellung von pkomp <i>mccRS cat</i>	GCGGATCCTACTCTTTTCTAGTGTAGCAC (<i>BamHI</i>)	
55	Chloramphenicol-	CCGGATCCCGGTTTTTGTAAATCCGCCATATTG (<i>BamHI</i>)	2
56	Resistenzgenkassette (<i>cat</i>) für pkomp <i>mccRS cat</i>	GGGGATCCCGAATTTCTGCCATTCATCCGCTTATTATC (<i>BamHI</i>)	
57	Korrektur der Leseraster-	GATGGTCTATCTCTCCAAAAGCGAGACCGAC	2
58	Mutation in <i>mccR</i> für pkomp <i>mccR⁺S cat</i>	GTCGGCTCTCGCTTTTGGAGAGATAGACCATC	
59	Bereich stromaufwärts von <i>mccA</i>	GATAACGAGGGCAAAAAATGGGCATTGAGGTTGAGGTG	11
	einschließlich <i>mccA</i> für pkomp <i>mccA kan</i>	Primer 12	

	<i>kan</i> für das Plasmid pkomp mccA kan	Primer 13 Primer 14	11
	<i>mcc</i> -Promotorelement für pkomp mccA kan	Primer 15 Primer 16	11
60	stromabwärts von <i>mccA</i> liegender Bereich für pkomp mccA kan	Primer 17 GAATTCGGGACCGCGGTCTCCGCTATCAAAGGGTGTCCC	11
61	lineares Plasmid pkomp <i>mcc</i> zur Insertion des Twin-Streptag-	CCAAAGCCACGTTGTGTCTC (<i>blunt-end-Ligation</i>)	11
62	Nukleotid am 3'-Ende von <i>mccA</i>	AAGGCTCTTTTTCATGATTCTCTGCGC (<i>blunt-end-Ligation</i>)	
63	Twin-Streptag-Nukleotid für pkomp mccA-twS kan	AGCGCGTGGAGCCATCC (<i>blunt-end-Ligation</i>)	11
64		TTATTATTCTCGAACTGAGGGTGGCTCC (<i>blunt-end-Ligation</i>)	
65	lineares Plasmid pkomp mccA_C399A-twS kan	CCGGCAGTGAAGGCTCACAGACTACTTTTACC	12, 14
66		CTCCTGGTCCCATTGGATTGAATTTAGAGC	
67	lineares Plasmid pkomp mccA_C495A-twS kan	GCTGAAAACCTCTATGCGATCC	13, 14
68		GCTCATCATGAAAGGCATATGG	
69	lineares Plasmid pkomp <i>mcc</i> für Twin-Streptag-Nukleotid am 3'- Ende von <i>mccC</i>	CGAGAAATAATATTAGCCATGAATGAAGCG TCCACGCGCTAACTCCTACTTTCACAAC	15
71	Twin-Streptag-Nukleotid für pkomp <i>mccC</i> -twS	AGTAGGAGTTAGCGCGTGGAGCCATCC	15
72		ATGGCTAATATTATTCTCGAACTGAGG	
73	lineares Plasmid pkomp <i>mccC</i> _F158L-twS	TATGTCTTGGCACTAAGCTGGCC	16, 28
74		AATTGCAATTCTCCGCTGCCTTGG	
75	lineares Plasmid pkomp <i>mccC</i> _F158W-twS	GGTGTCTTGGCACTAAGCTGGCC Primer 74	17, 29
76	stromaufwärts von <i>mccL</i> liegender Bereich für pkomp	GATAACGAGGGCAAAAAATGGATGATATCGCTTGCAATAG	18
77	P_{mcc} <i>mccL</i> -IS <i>aadA</i>	GTGATTCTTCTCATAAATCCTTTCTTTAGGGC	
78	<i>mcc</i> -Promotorelement für pkomp P_{mcc} <i>mccL</i> -IS <i>aadA</i>	GGATTATGAGAAGAATCACGCCCTTTG	18
79		TCTTCAACATGTTCTCCTTTCAAACAC	
80	Fragment <i>mccL</i> -IS für pkomp P_{mcc} <i>mccL</i> -IS <i>aadA</i>	AGGAGGAAACATGTTGAAGAAGATTTTAGGATTGTG	18
81		GGGATCCTACTTATTATTTTCGAACTGCGGG	
82	Spektinomycin- Resistenzgenkassette (<i>aadA</i>) für pkomp P_{mcc} <i>mccL</i> -IS <i>aadA</i>	GAAAAATAATAAGTAGGATCCCGAATTTCTG CCTCCACGAGGGGATCCCGGTTTTGTAAATC	18
83			
84	stromabwärts von <i>mccL</i> liegender Bereich für pkomp	CCGGGATCCCCTCGTGGAGGGATTGTGAG	18
85	P_{mcc} <i>mccL</i> -IS <i>aadA</i>	CGAATTCGGGACCGCGGTCTCCCTTTTGATCTCAAACCAAATTC	

86	lineares pkomp P _{mcc} mccL_C42A_C45A_M47L- <i>lS</i>	GCTGGGGCTGATTTGGTGAAGTTTCACAAGACC	19
87	aadA	ATTAGGAGCATATTGTTTCGCCTCTCC	
88	lineares pkomp P _{mcc} mccL_C236A_C239A_M241L- <i>lS</i>	CAGGAGCGTTTGTGGCGAAGTATCCCC	20
89	aadA	CTATGGGCGCCTTTGCCTCTTTGGGGAC	
90	<i>mccC</i> -Leserahmen zur Konstruktion von pPR1 <i>mccC</i>	G TTCACGGTCTCAAATGCAAGAGGTGGAATCTGTAGGAGAG	21
91		GTTCTGGGTCTCAGCGCAACTCTACTTTTCACAACAGGTATG	
92	lineares Plasmid pPR1 <i>mccC</i> für die Fusion mit <i>malE-TEV</i> am 5'- Ende von <i>mccC</i>	GAGAACCTGTATTTCCAGTCAGTGAATCTGTAGGAGAGAAGCCTC	27
93		TTGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC	
94	<i>malE-TEV</i> für die Fusion am 5'- Ende von <i>mccC</i>	TTTAAGAAGGAGATATACAAATGATGTTTCCGCCTCGGCTCTCG	27
95		GACTGGAAATACAGGTTCTCCTTGGTGATACGAGTCTGTGCATCTTTCAGCG	
96	<i>mccL</i> -Leserahmen zur Konstruktion von pASK2	G TTCACGGTCTCCAATGTTCCAAAGCGTGCCCAAGG	31
97	<i>mccL</i> Δ1-19	G TGGTCTCTGCGCTCAATCCCTCCACGAGCTTCTC	
98	lineares Plasmid pASK IBA 3 mit SASPQP-Leserahmen zwischen MCS und Streptag	AACCCG CAGTGGAGCCACCCG CAGTTCG	31
99		C GGCTGGCTAGCGCTGAGACCATGGTCCC	
100	<i>mccL</i> -Leserahmen zur Konstruktion von pASK3 <i>mccL</i> - <i>lS</i>	G TTCACGGTCTCCAATGTTGAAGAAGATTTTAGGATTG Primer 97	32

5.2.2. Plasmide

Tabelle 4. In dieser Arbeit verwendete Plasmide. Links sind die in dieser Arbeit verwendeten Namen gelistet, rechts eine grundlegende Beschreibung der enthaltenen Sequenzen, Resistenzgen-Kassetten und die Nennung der direkt von diesen abgeleiteten Plasmide. Für die Plasmidkarten siehe Abbildung 47.

Nr.	Plasmidname	Beschreibung
1	pΔmccRS::kan	Kanamycin-Resistenzgen-Kassette zwischen den flankierenden Bereichen von <i>mccR</i> und <i>-S</i> ; Km ^R
2	pkomp mccR ⁺ S cat	Sequenz <i>mccRS</i> , <i>mccR</i> mit Deletion A492; Cm ^R
3	pΔmccA::kan	Kanamycin-Resistenzgen-Kassette zwischen den flankierenden Bereichen von <i>mccA</i> ; Km ^R
4	pkomp mccBCD	<i>mcc</i> -Promotorelement gefolgt von <i>mccBCD</i> ; Km ^R
5	pkomp ΔP _{mcc} mccBCD	Bereich <i>mccBCD</i> ohne <i>mcc</i> -Promotorelement; Km ^R
6	pΔmccB::kan	<i>mcc</i> -Promotorelement gefolgt von <i>mccCD</i> ; Km ^R
7	pΔmccC::kan	<i>mcc</i> -Promotorelement gefolgt von <i>mccB</i> und <i>-D</i> ; Km ^R
8	pΔmccD::kan	<i>mcc</i> -Promotorelement gefolgt von <i>mccBC</i> und dem 3'-Ende von <i>mccD</i> ; Km ^R
9	pΔmccEF::apr	Apramycin-Resistenzgen-Kassette gefolgt von <i>mcc</i> -Promotorelement, umgeben von den flankierenden Bereichen von <i>mccE</i> und <i>-F</i> ; Apr ^R
10	pΔmccL::kan	Kanamycin-Resistenzgen-Kassette zwischen den flankierenden Bereichen von <i>mccL</i> ; Km ^R
11	pkomp mccA-twS	<i>mccA</i> mit am 3'-Ende fusionierten Twin-Streptag-Nukleotid; Km ^R
12	pkomp mccA_C399A-twS	von 11, <i>mccA</i> mit Mutation C399A; Km ^R
13	pkomp mccA_C495A-twS	von 11, <i>mccA</i> mit Mutation C495A; Km ^R
14	pkomp mccA_C399A_C495A-twS	von 11, <i>mccA</i> mit Mutationen C399A und C495A; Km ^R
15	pkomp mccC-twS	von 4, <i>mccC</i> mit am 3'-Ende fusionierten Twin-Streptag-Nukleotid; Km ^R
16	pkomp mccC_F158L-twS	von 15, <i>mccC</i> mit Mutation F158L; Km ^R
17	pkomp mccC_F158W-twS	von 15, <i>mccC</i> mit Mutation F158W; Km ^R
18	pkomp P _{mcc} mccL-IS aadA	<i>mcc</i> -Promotorelement gefolgt von <i>mccL</i> , welches am 3'-Ende mit dem Nukleotid für SASQP und einem Streptag fusioniert ist; Spect ^R
19	pkomp P _{mcc} mccL_N-IS aadA	von 19, <i>mccL</i> mit Mutationen C42A, C45A und M47L; Spect ^R
20	pkomp P _{mcc} mccL_C-IS aadA	von 19, <i>mccL</i> mit Mutationen C236A, C239A und M241L; Spect ^R
21	pΔmqnK::kan	Kanamycin-Resistenzgen-Kassette zwischen den flankierenden Bereichen von <i>mqnK</i> ; Km ^R [23]

22	pBR322	Rückgrat für Plasmide 1 und 2
23	pPR IBA 1	Rückgrat für Plasmide 10 und 26
24	pASK IBA 2	Rückgrat für Plasmid 28, kodiert für <i>ompA</i> -Signalsequenz
25	pASK IBA 3	Rückgrat für Plasmide 3-9, 11-20 und 31
26	pPR1 <i>mccC</i>	Rückgrat für Plasmid 27
27	pPR1 <i>malE</i> Δ 1-20- TEV- <i>mccC</i> Δ 1-31-strep	Produktion von MBP-TEV-MccC-Strep in <i>E. coli</i> unter P _{T7} ; Amp ^R
28	pPR1 <i>malE</i> Δ 1-20- TEV- <i>mccC</i> Δ 1-31_F158L-strep	von 27, Produktion von MBP-TEV-MccC_F158L-Strep in <i>E. coli</i> unter P _{T7} ; Amp ^R
29	pPR1 <i>malE</i> Δ 1-20- TEV- <i>mccC</i> Δ 1-31_F158W-strep	von 27, Produktion von MBP-TEV-MccC_F158W-Strep in <i>E. coli</i> unter P _{T7} ; Amp ^R
30	pASK2 <i>mccL</i> Δ 1-19	Produktion von MccL mit der <i>OmpA</i> -Signalsequenz unter P _{tet} ; Amp ^R
31	pASK IBA 3-IS	Rückgrat für Plasmid 30
32	pASK3 <i>mccL</i> -IS	Enthält den Leserahmen von <i>MccL</i> -IS, welcher der Erstellung von Plasmid 18 dient
33	pCOLA Fe/S kan	Konstitutive Produktion der ISC-Proteine zur Reifung von Fe-S-Zentren

5.3. Verwendete Stämme und Mutanten

Tabelle 5. Während dieser Arbeit verwendeten Stämme und Mutanten von *W. succinogenes* und *E. coli*.

Nr.	Stamm/Mutante	Beschreibung	Referenz
1	<i>W. succinogenes</i> DSM 1740	Wildstamm	DSMZ
2	<i>W. succinogenes</i> Δ <i>mccRS::kan</i>	Austausch von <i>mccRS</i> gegen eine Kanamycin-Resistenzgen-Kassette; Km ^R	Diese Arbeit
3	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ <i>cat</i>	Deletion des Desoxyadenosin-Monophosphat-Nukleotids A492; Cm ^R	Diese Arbeit
4	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ Δ <i>mccA::kan</i>	wie 3 mit Austausch von Nukleotiden 502–2073 von <i>mccA</i> gegen eine Kanamycin-Resistenzgen-Kassette; Cm ^R ; Km ^R	Diese Arbeit
5	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ komp <i>mcc</i>	wie 3 mit Insertion einer Kanamycin-Resistenzgen-Kassette und einem <i>mcc</i> -Promotorelement zwischen <i>mccA</i> und <i>-B</i> ; Cm ^R ; Km ^R	Diese Arbeit
6	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ komp Δ P _{<i>mcc</i>} <i>mcc</i>	wie 3 mit Insertion einer Kanamycin-Resistenzgen-Kassette ohne <i>mcc</i> -Promotorelement zwischen <i>mccA</i> und <i>-B</i> ; Cm ^R ; Km ^R	Diese Arbeit

7	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ <i>ΔmccB::kan</i>	wie 5 ohne Nukleotide 1–760 des <i>mccB</i> -Gens; Cm ^R ; Km ^R	Diese Arbeit
8	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ <i>ΔmccC::kan</i>	wie 5 ohne Nukleotide 1–654 des <i>mccC</i> -Gen; Cm ^R ; Km ^R	Diese Arbeit
9	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ <i>ΔmccD::kan</i>	wie 5 ohne Nukleotide 1–429 des <i>mccD</i> -Gens; Cm ^R ; Km ^R	Diese Arbeit
10	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ <i>ΔmccEF::apr</i>	wie 3 ohne Nukleotide 4–531 von <i>mccE</i> und 1–829 von <i>mccF</i> , diese wurden durch eine Apramycin-Resistenzgen-Kassette gefolgt von einem <i>mcc</i> -Promotorelement ausgetauscht; Cm ^R ; Apr ^R	Diese Arbeit
11	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ <i>ΔmccL::kan</i>	wie 3 ohne den <i>mccL</i> -Leserahmen; Cm ^R ; Km ^R	Diese Arbeit
12	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ <i>mccA-twS</i>	Wie 5 mit Insertion des Nukleotids für den Twin-Streptag am 3'-Ende von <i>mccA</i> ; Cm ^R ; Km ^R	Diese Arbeit
13	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ <i>mccA_C399A-twS</i>	Wie 12 mit Austausch des Codons für C399 (TGC) gegen A399 (GCC); Cm ^R ; Km ^R	Diese Arbeit
14	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ <i>mccA_C495A-twS</i>	Wie 12 mit Austausch des Codons für C495 (TGC) gegen A495 (GCC); Cm ^R ; Km ^R	Diese Arbeit
15	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ <i>mccA_C399A_C495A-twS</i>	Wie 12 mit Austausch der Codons für C399 und C495 gegen die für A399 und A495; Cm ^R ; Km ^R	Diese Arbeit
16	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ <i>mccC-twS</i>	Wie 5 mit Insertion des Nukleotids für den Twin-Streptag am 3'-Ende von <i>mccC</i> ; Cm ^R ; Km ^R	Diese Arbeit
17	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ <i>mccC_F158L-twS</i>	Wie 16 mit Austausch des Codons für F158 (TTC) gegen L158 (TTA) ; Cm ^R ; Km ^R	Diese Arbeit
18	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ <i>mccC_F158W-twS</i>	Wie 16 mit Austausch des Codons für F158 (TTC) gegen W158 (TGG); Cm ^R ; Km ^R	Diese Arbeit
19	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ P _{mcc} <i>mccL-ls aadA</i>	Wie 3 mit Insertion eines <i>mcc</i> -Promotorelementes stromaufwärts von <i>mccL</i> sowie eines verlängerten Streptags an dessen 3'-Ende; Cm ^R ; Spect ^R	Diese Arbeit
20	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ P _{mcc} <i>mccL_N-ls aadA</i>	Wie 19 mit Austausch der Codons C42 (TGC) und C45 (TGC) M47 (ATG) gegen A42 (GCG) A45 (GCT) und L47 (TTG); Cm ^R ; Spect ^R	Diese Arbeit
21	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ P _{mcc} <i>mccL_C-ls aadA</i>	Wie 19 mit Austausch der Codons C236 (TGC) und C239 (TGC) M241 (ATG) gegen A42 (GCG) A45 (GCT) und L47 (TTG); Cm ^R ; Spect ^R	Diese Arbeit
22	<i>W. succinogenes</i> <i>mccR</i> ⁺ <i>ΔmqnK::kan</i>	Wie 3, wobei der <i>mqnK</i> -Leserahmen durch eine Kanamycin-Resistenzgen-Kassette ausgetauscht wurde [23]; Cm ^R ; Km ^R	Sascha Hein
23	<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac</i> <i>glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ ΔlacIq Δ(lacZ)M15]</i> <i>hsdR17(rK⁻ mK⁺)</i> , Vermehrung von Plasmiden	Agilent

24	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Codon Plus RIL pASK2 mccL-1S	B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tetr <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW</i> Cm ^R], das Plasmid pASK2 mccL-1S dient der Produktion von MccL-1S	Agilent
25	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Codon Plus RIL pASK2 mccL_N-1S	B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tetr <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW</i> Cm ^R], das Plasmid pASK2 mccL_N-1S dient der Produktion von MccL_N-1S	Agilent
26	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Codon Plus RIL pASK2 mccL_C-1S	B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tetr <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW</i> Cm ^R], das Plasmid pASK2 mccL_C-1S dient der Produktion von MccL_C-1S	Agilent
27	<i>E. coli</i> C43(DE3) pCOLA Fe/S kan, pPR1 malEΔ1-20-TEV-mccCA1-31-strep	B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm</i> ⁺ <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> , das Plasmid pCOLA Fe/S kan diente der Produktion von Fe-S-Protein reifenden Enzymen, pPR1 malEΔ1-20-TEV-mccCA1-31-strep diente der Produktion von MBP-TEV-MccC-Strep	Agilent
27	<i>E. coli</i> C43(DE3) pCOLA Fe/S kan, pPR1 malEΔ1-20-TEV-mccCA1-31_F158L-strep	B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm</i> ⁺ <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> , das Plasmid pCOLA Fe/S kan diente der Produktion von Fe-S-Protein reifenden Enzymen, pPR1 malEΔ1-20-TEV-mccCA1-31_F158L-strep diente der Produktion von MBP-TEV-MccC_F158L-Strep	Agilent
28	<i>E. coli</i> C43(DE3) pCOLA Fe/S kan, pPR1 malEΔ1-20-TEV-mccCA1-31_F158W-strep	B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>dcm</i> ⁺ <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> , das Plasmid pCOLA Fe/S kan diente der Produktion von Fe-S-Protein reifenden Enzymen, pPR1 malEΔ1-20-TEV-mccCA1-31_F158W-strep diente der Produktion von MBP-TEV-MccC_F158W-Strep	Agilent

5.4. Nährmedien

5.4.1. Medien für die Kultivierung von *Wolinella succinogenes*

Die in dieser Arbeit verwendeten Medien wurden abgeleitet nach den von Kröger et al. [29] verwendeten. Als Elektronendonator diente stets Formiat. Alle Medien wurden aus 10-fach konzentrierten Stammlösungen verdünnt nach der Zusammenstellung mit 0,5 % (w/v) BHI supplementiert. Medium mit Volumina zwischen 10 mL und 500 mL wurden in luftdicht verschließbaren Gefäßen durch fünfmaliges Wechseln der Gasphase anaerobisiert und anschließend bei 121 °C für 15 min autoklaviert. 10 L-Kulturen wurden in Enghals-Standflaschen zusammengemischt, anschließend autoklaviert und vor der Inokulierung durch 15-minütiges Spülen mit Stickstoff unter Rühren des Mediums von Sauerstoff befreit.

Tabelle 6. Flüssigmedien für die Anzucht von *W. succinogenes*.

Formiat-Fumarat (100/90) bzw. (100/45)		Formiat-Fumarat-Sulfit (100/45/10)	
Tris HCl	50 mM	Tris HCl	50 mM
Natriumformiat	100 mM	Natriumformiat	100 mM
Fumarsäure	90 mM bzw. 45 mM	Fumarsäure	45 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 mM	Na ₂ SO ₃	10 mM
NH ₄ Cl	5 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 mM
K ₂ HPO ₄	20 mM	NH ₄ Cl	5 mM
Natrium-Acetat	20 mM	K ₂ HPO ₄	20 mM
Glutaminsäure	1 mM	Natrium-Acetat	20 mM
CaMg-Mix	2 mL/L	Glutaminsäure	1 mM
SL-8-Spurenelementsg.	200 µL/L	CaMg-Mix	2 mL/L
	pH 7,9	SL-8-Spurenelementsg.	200 µL/L
			pH 7,5
Formiat-Nitrat (80/50)		Formiat-Sulfit (100/10)	
Tris HCl	50 mM	Tris HCl	50 mM
Natriumformiat	80 mM	Natriumformiat	100 mM
KNO ₃	50 mM	Na ₂ SO ₃	10 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 mM
K ₂ HPO ₄	1 mM	NH ₄ Cl	5 mM
Fumarsäure	5 mM	K ₂ HPO ₄	20 mM
Glutaminsäure	1 mM	Natrium-Acetat	20 mM
CaMg-Mix	2 mL/L	Glutaminsäure	1 mM
SL-8-Spurenelementsg.	200 µL/L	CaMg-Mix	2 mL/L
	pH 7,5	SL-8-Spurenelementsg.	200 µL/L
			pH 7,3

Tabelle 7. Zusammensetzung der SL8-Spurenelementelösung und des CaMg-Mix.

SL8-Spurenelementelösung		CaMg-Mix	
Natrium-EDTA	14 mM	CaCl ₂	50 mM
FeCl ₂	12 mM	MgCl ₂	250 mM
ZnCl ₂	515 μ M		
MnCl ₂	618 μ M		
H ₂ BO ₃	1 mM		
CoCl ₂	800 μ M		
CuCl ₂	100 μ M		
NiCl ₂	100 μ M		
Na ₂ MoO ₄	150 μ M		

5.4.2. Medien für die Kultivierung von *Escherichia coli*

Für die Erstellung kompetenter Zellen, die Anzucht für die Reinigung von DNA sowie für Vorkulturen für die Proteinproduktion wurde LB-Medium verwendet. Zellen, welche für die Proteinproduktion eingesetzt werden sollten, wurden in TB-Medium vermehrt.

Tabelle 8. Zusammensetzung der Medien für die Anzucht von *E. coli*

LB-Medium		TB-Medium	
Hefeextrakt	5 g/L	Trypton	12 g/L
Trypton	10 g/L	Hefeextrakt	24 g/L
Glucose	1 g/L	Glycerin	4 mL/L
		10 X Phosphat-Puffer	100 mL/L

Tabelle 9. Zusammensetzung des 10 X Phosphat-Puffers.

K ₂ HPO ₄	720 mM
KH ₂ PO ₄	170 mM

Für die Herstellung von LB-Medium wurden alle Bestandteile zusammengegeben und bei 121 °C für 15 min autoklaviert. Für die Herstellung des TB-Mediums wurden zuerst Trypton, Hefeextrakt und Glycerin mit Wasser auf 900 mL aufgefüllt und anschließend wie LB-Medium autoklaviert. Nach Abkühlen wurden steril 100 mL des 10 X Phosphat-Puffers hinzugegeben.

5.4.3. Verwendete Antibiotika

Verwendete Antibiotika wurden als Stammlösung 1000-fach in dH₂O Wasser oder im Fall von Chloramphenicol in HPLC-reinem Ethanol angesetzt.

Tabelle 10. während dieser Arbeit verwendete Antibiotika sowie deren Endkonzentration.

Antibiotikum	Konzentration [mg/L] für				
	<i>E. coli</i>	<i>W. succinogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>W. succinogenes</i>	
Ampicillin	100	50	Kanamycin	50	25
Apramycin	60	30	Spektinomycin	100	50
Chloramphenicol	25	12,5			

5.5. Zellzucht

5.5.1. Zellzucht von *Wolinella succinogenes*

W. succinogenes wurde anaerob unter einer Stickstoffatmosphäre mit Formiat als Elektronendonator und wahlweise Fumarat, Nitrat, Sulfit, oder einer Mischung aus Fumarat und Sulfit als Elektronenakzeptoren angezogen. Falls nötig, wurden Medien vor Beimpfen mit geeigneten Antibiotika supplementiert. Mit Ausnahme der 10 L-Fermenter wurden Kulturen und Antibiotika steril via Einwegspritzen übertragen. Für das Anlegen von länger beständigen Kulturen ohne Einfrieren wurden Zellen der jeweiligen Mutante in 10 mL Hungate-Röhrchen in Formiat-Fumarat-Medium bei 37 °C über Nacht vermehrt und anschließend bei 4 °C gelagert. Zur Selektion von Transformanden wurden Zellen in Formiat-Nitrat-Weichagar (supplementiert mit 2,6 % (w/v) BHI-Agar) mit geeigneten Antibiotika eingegossen und unter Stickstoffatmosphäre bei 37 °C inkubiert.

5.5.2. Zellzucht von *Escherichia coli*

E. coli wurde entweder in Flüssig- oder Festmedium, welches je nach Plasmid mit passenden Antibiotika supplementiert war, vermehrt. Für die Selektion von frisch transformierten Zellen wurde LB-Agar verwendet. Für die Vermehrung von Plasmiden mittels *E. coli* oder Vorkulturen für Proteinproduktion wurde *E. coli* auf LB-Flüssigmedium bei 37 °C und 180 rpm angezogen. Kulturen für die Proteinproduktion wurden in TB-Medium in Schikane-Kolben inkubiert. Für die Produktion von MBP-TEV-MccC-Strep wurden die Medien nach Induktion mittels Parafilm luftdicht abgeschlossen.

5.5.3. Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte von wachsenden Kulturen wurde photometrisch mit dem Genesys™ 10S UV-VIS Spektrometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) bei 578 nm für *W. succinogenes* und 600 nm für *E. coli* bestimmt. Als Referenz dienten das jeweilige nicht-inokulierte Medium.

5.6. Molekularbiologische Methoden

5.6.1. Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifikation von Genen oder die Kontrolle von Genotypen wurde die PCR nach Kary Mullis [30] durchgeführt. Als Template für die Amplifikation dienten je nach Zweck je 50 ng genomische DNA oder 10 ng zuvor isoliertes Plasmid. Für die Amplifikation von Genfragmenten wurde entweder die Q5-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) oder die Phusion-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) verwendet. Für die Kontrolle von Genotypen durch Amplifikation ausgewählter Genom- oder Plasmid-Bereiche wurde die OneTaq-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) gewählt und nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Die PCR wurde in einem Thermo-Cycler von Biometra TAdvanced (Analytic Jena, Jena).

5.6.2. Agarose-Gelelektrophorese und qualitative Detektion von DNA

Um den Erfolg einer PCR oder einer Restriktion zu überprüfen, wurden besagte Ansätze in einem 0,8 % (w/v) Agarose-Gel zusammen mit einem Marker (N0469, New England Biolabs, Frankfurt am Main) aufgetrennt, bis der Indikator Orange G die der Kathode zugewandten Seite des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde anschließend in einem Bad mit 0,1 % (w/v)

Ethidiumbromid für 15 min inkubiert. Zur Detektion von DNA wurde es anschließend in einem UV-Detektor INTAS GelStick Manager mit einer Emission bei 320 nm fotografiert.

Tabelle 11. Zusammensetzung des DNA-Proben- und Laufpuffers (einfach konzentriert)

Probenpuffer		Laufpuffer	
Glycerin	10 % (w/v)	Tris	40 mM
Ficoll®-400	2.5 % (w/v)	Essigsäure	20 mM
Tris (base)	3.33 mM	EDTA	1 mM
EDTA	10 mM		pH 8.5
SDS	0.08 % (w/v)		
Xylencyanol	0.005 % (w/v)		
Bromphenolblau	0.005 % (w/v)		
Orange G	0.02 % (w/v)		
	pH 8.0 mit HCl eingestellt		

5.6.3. Reinigung von DNA

Für die Reinigung von Plasmiden aus *Escherichia coli* wurde das GenElute Plasmid Miniprep Kit (PLN70-1KT, Merck), zur Reinigung von mittels PCR amplifizierten Fragmenten wurde das GenElute PCR Clean-Up Kit (NA1020-1KT) von Sigma-Aldrich bzw. Merck verwendet. Die Reinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem Unterschied, dass die DNA mit je 40 μ L dH₂O anstelle des mitgelieferten Elutionspuffers eluiert wurde. Die Konzentration an gereinigter DNA wurde in einem Spektrophotometer (DeNovix-DS11) mittels der E₂₆₀, die Reinheit über das Verhältnis von E₂₆₀ zu E₂₈₀ bestimmt.

5.6.4. Strategien der Plasmidkonstruktion

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden über die drei im Folgenden erläuterten Methoden erstellt.

Die in Tabelle 4 Plasmide 2, 24, 26 und 30 wurden durch Restriktion mit anschließender Ligation erstellt. Die zu ligierenden Fragmente wurden in einer PCR mit geeigneten Primern amplifiziert, was in den gewünschten Restriktionsstellen an den der Amplifikate resultierte. Die

erhaltenen Amplifikate sowie das Plasmid wurden mittels Restriktion mit einer geeigneten Restriktions-Endonuklease geschnitten. Nach Reinigung der geschnittenen Fragmente wurden diese anschließend in einem Ansatz mittels T4-Ligase ligiert.

Die Plasmide 5–9, 12–14, 16, 17, 19, 20, 28, 29 und 31 wurden mittels Amplifikation mit geeigneten Primern, gefolgt von Zyklisierung des Produktes konstruiert. Im Fall der Deletionsplasmide 5–9 dienten die Primer der Amplifikation des Plasmides 4 unter Auslassen des zu deletierenden Bereiches. Im Fall der übrigen Plasmide wurde mithilfe der passenden Primer das jeweilige Template (Plasmid 11 für 12–14, Plasmid 4 für 16 und 17, Plasmid 18 für 19 und 20, Plasmid 24 für 32 sowie Plasmid 27 für 28 und 29) mit der gewünschten Mutation amplifiziert. Nach Reinigung PCR-Produktes wurde das komplette Eluat mit 4 μL Cut-Smart-Puffer versetzt und mit 0,5 μL *DpnI* für 1 h bei 37 °C und 350 rpm inkubiert, um das ursprünglich eingesetzte Plasmid entfernen. Anschließend wurde das Produkt erneut gereinigt und in einem Ansatz im Thermo-Cycler (Biometra TAdvanced) 5'-phosphoryliert und ligiert.

Tabelle 12. Ansatz für die Phosphorylierung und Ligation der PCR-generierten Plasmide

Reaktionsansatz		Inkubations-Programm	
T4-Ligase-Puffer	1 μL	Temperatur	Inkubationszeit
Template	50 ng	37 °C	1 h
dH ₂ O	ad 9 μL	10 °C	2 h
T4-Polynukleotid-Kinase	0,5 μL	20 °C	1 h
T4-Ligase	0,5 μL	30 °C	30 min
		60 °C	2 min

Die in Tabelle 4 gezeigten Plasmide 26 und 32 wurden über die Golden-Gate-Assembly-Methode erstellt. Auch hier wurden die zu ligierenden Fragmente in einer PCR mit geeigneten Primern amplifiziert und so zwei *BsaI*-Restriktionstellen an den Enden der Amplifikate hinzugefügt. Nach Restriktion des Rückgrates und des amplifizierten Fragmentes durch *BsaI* wurde dessen eigene Erkennungsstelle aus diesen zu ligierenden Sequenzen entfernt. Dies sorgte für eine gerichtete Reaktion und machte eine weitere DNA-Reinigung vor der Ligation unnötig. Anschließend wurden der T4-Ligase-Puffer sowie die T4-Ligase direkt zum Ansatz hinzugegeben und nach den in Tabelle 13 gezeigten Bedingungen inkubiert.

Tabelle 13. Restriktions- und Ligations-Ansatz für die Erstellung von Plasmiden nach der Golden-Gate Assembly-Methode [31]. Die Inkubation erfolgte auf dem Thermoschüttler bei 350 rpm.

Restriktions- und Ligationsansatz		Inkubationsbedingungen	
Cut-Smart-Puffer	1 μL	37 °C	1 h
(New England Biolabs)		20 °C	2 h
T4-Ligase-Puffer	0,5 μL	30 °C	30 min
Plasmid	100 pmol	60 °C	2 min
Fragment(e)	je 300 pmol	4 °C	bis zur Transformation
dH ₂ O	ad 9 μL	20 °C	
<i>Bsa</i> I	0,5 μL		
T4-Ligase	0,5 μL		

Die Plasmide 3, 4, 9, 11, 18 und 27 wurden durch isothermales Assembly nach Gibson [32] konstruiert. Hierbei wurden PCR-Produkte amplifiziert, welche je 10 oder 20 Nukleotide lange Überhänge besaßen, die mit den Enden später benachbarter Fragmente übereinstimmten. Je 50 ng der gereinigten Fragmente wurden mittels Hifi-Assembly zunächst von einer 5'-Endonuklease teilweise verdaut, sodass einzelsträngige Enden entstanden. Die freigelegten Enden, welche im assemblierten Plasmid benachbart zu liegen kommen, sind zueinander komplementär und können somit hybridisieren. Im Folgenden komplementiert eine DNA-Polymerase die übrigen Lücken und eine Ligase verbindet die hybridisierten Fragmente. Zusammengemischte.

Tabelle 14. Restriktions- und Ligations-Ansatz für die Erstellung von Plasmiden mittels Isothermalem Assembly. Die Inkubation erfolgte in einem Thermo-Cycler (Biometra, Göttingen)

Restriktions- und Ligationsansatz		Inkubationsbedingungen	
NEBuilder® HiFi DNA	10 μL	50 °C	15 min
Assembly Cloning Kit		55 °C	15 min
DNA-Fragmente	je 100 ng	50 °C	15 min
dH ₂ O	ad 20 μL		

5.6.5. Sequenzierung erstellter Plasmide und PCR-Amplifikate

Für die Kontrolle der korrekten Sequenz wurden PCR-Amplifikate oder Plasmide zunächst gereinigt und anschließend eine ausreichende Menge an DNA in einem Ansatz mit einem geeigneten Primer zu einem Sequenzierungs-Service, zunächst zur Microsynth AG (Balgach, Schweiz), später zu Eurofins Scientific SE (Ebersberg, Deutschland) geschickt.

5.7. Mikrobiologische Methoden

5.7.1. Transformation von *Escherichia coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden tiefgekühlte kompetente Zellen verwendet. Für die Erstellung kompetenter Zellen wurde LB-Medium 1:50 mit einer Vorkultur inokuliert und bei 30 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet, mit 2,3 mL 50 % (w/v) Glycerin- und 2,7 mL 100 mM CaCl₂-Lösung versetzt und resuspendiert. Die Suspension wurde in Aliquots zu 50 µL aufgeteilt, mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Transformation gelagert.

Kompetente Zellen wurden für eine Transformation zunächst auf Eis für 15 min getaut. Das Plasmid für die Transformation wurde hinzugegeben, der Ansatz durchmischt und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s. Die Zellen wurden anschließend für 1 h bei 37 °C und 400 rpm geschüttelt und dann auf einer LB-Agar-Platte mit geeignetem Antibiotikum über Nacht selektiert.

Die Klone gewachsener *E. coli*-Kulturen wurden in LB-Flüssigmedium mit passenden Antibiotika vermehrt, danach das Plasmid geerntet, mittels Test-Restriktion analysiert und sequenziert.

5.7.2. Transformation von *Wolinella succinogenes*

Falls nicht anders angegeben, wurden Zellen für die Transformation von *W. succinogenes* in Formiat-Nitrat-Medium vermehrt.

Für die Transformation von *W. succinogenes* wurden Zellen direkt zuvor kompetent gemacht. Es wurden zunächst 10 mL Formiat-Nitrat-Medium, supplementiert mit geeigneten Antibiotika 1:20 mit einer Vorkultur inokuliert und für etwa 4 h vermehrt (OD₅₇₈ von etwa 0,3). Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation mit 3300 rcf bei 4 °C für 10 min geerntet. Sedimentierte Zellen wurden in 10 mL gekühlter 0,3 M Saccharose-Lösung resuspendiert und anschließend wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 200 µL dekantiert und die Zellen im verbliebenden Volumen resuspendiert. Es wurden zwischen 1 µg und 4 µg Plasmid

zugegeben und die Zellen mithilfe des GenePulser und Pulse Controller (Bio-Rad, München) bei 1250 V, 800 Ω und 25 μ F elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 mL Formiat-Nitrat-Medium aufgenommen, in ein Hungate-Röhrchen überführt und durch zweimaliges Spülen mit Stickstoff anaerobisiert. Die transformierten Zellen wurden für 90 min bei 37 °C inkubiert, anschließend in 25 mL etwa 39 °C warmen Antibiotika-supplementiertem Brain-Heart-Infusion Agar (26 g/L) auf Formiat-Nitrat-Basis eingegossen und in einem luftdichten Inkubierer (Schuett-Biotech, Göttingen) durch dreimaliges Spülen mit Stickstoff anaerobisiert. Nach 3 Tagen Inkubation bei 37 °C wurden gewachsene Kolonien in je 1 mL Formiat-Nitrat-Medium ohne Antibiotika übertragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Danach wurden pro gewachsene 1 mL-Kultur je 10 mL Formiat-Nitrat inokuliert, entsprechende Antibiotika zur Selektion auf positive Transformanden zugefügt und über Nacht vermehrt. Gewachsene Kulturen wurden dann mittels PCR und Sequenzierung auf doppelt homologe Rekombination hin überprüft.

5.8. Produktion von Mcc-Proteinen

5.8.1. Heterologe Proteinproduktion in *Escherichia coli*

Für die Proteinproduktion mittels *E. coli* wurde von einer Platte mit positiven Transformanden eine Kultur in 5 mL LB-Medium mit dem passenden Antibiotikum übertragen und bei 37 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden hiervon 2 mL in eine Hauptkultur bestehend aus 1 L TB-Medium und passendem Antibiotikum übertragen. Hauptkulturen wurden zunächst aerob bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 1 vermehrt. Für die Produktion von MBP-TEV-MccC-Strep wurde IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM, für die Produktion von MccL-Strep oder MccL-IS AHT mit einer Endkonzentration von 200 ng/mL hinzugegeben. Für die Produktion von MBP-TEV-MccC-Strep wurde das Medium nach Induktion zusätzlich mit 500 μ M Ammoniumeisen(III)citrat supplementiert. Anschließend wurde das Medium luftdicht abgeschlossen und die Zellen bei 19 °C über Nacht (ca. 10 h) bei 80 rpm inkubiert.

5.8.2. Proteinproduktion in *Wolinella succinogenes*

Für die Proteinproduktion wurden von der geeigneten *W. succinogenes*-Mutante zunächst 300 μ L in 10 mL Formiat-Fumarat-Medium inokuliert, mit den passenden Antibiotika supplementiert und über Nacht bei 37 °C ohne Schütteln vermehrt. Am nächsten Tag wurden mit 1 mL der gewachsenen Kultur eine 100 mL-Vorkultur Formiat-Fumarat-Medium inokuliert

und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die gesamte gewachsene Vorkultur in eine 10 L-Hauptkultur in einer Enghals-Standflasche übertragen. Dieser wurden 10 mM Na₂SO₃ zugefügt und über Nacht bei 37 °C vermehrt.

5.8.3. Zellernte von *Wolinella succinogenes*

Die Hauptkulturen mit 10 L wurden zunächst über Tangentialfiltrationspumpe (Pellicon, Eschborn, Deutschland) mit einer 0,2 µm-Porengröße auf ein Volumen von um die 1 L konzentriert. Mit diesem wurde anschließend wie mit den Hauptkulturen von *E. coli* verfahren.

5.8.4. Zellernte von *Escherichia coli*

Hauptkulturen von *E. coli* wurden mit 8.000 rcf bei 4 °C für 10 min geerntet. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet entweder für spätere Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren oder in einem Hundertstel des ursprünglichen Volumens an entweder MBP-Trap- oder Streptactin-Puffer resuspendiert.

5.8.5. Zellaufschluss und Fraktionierung

Die pelletierten Zellen wurden je nach durchzuführender Affinitätschromatographie entweder in einem 50-stel des ursprünglichen Volumens an MBP-Trap Puffer W (für MBP-fusionierte Proteine) oder Streptactin Puffer W (für Streptag-fusionierte Proteine) aufgenommen (Tabelle 15). Der Aufschluss erfolge aerob mittels einer Ultraschallsonde (Branson Sonifier 250, Emerson, Langenfeld) in vier Zyklen zu je 2 min (Cycle 50 %, Output Control 5) mit je 1 min Pause zwischen den Zyklen. Danach wurde der Aufschluss mit 21.000 rcf für 30 min bei 4 °C zentrifugiert.

Tabelle 15. Zusammensetzung des MBP-Trap-Puffers für die Affinitätsreinigung von MBP-fusionierten Proteinen sowie des Streptactin-Puffers für die Affinitätsreinigung von Streptag-fusionierten Proteinen.

Bestandteil	MBP-Trap Puffer W	Streptactin Puffer W
Tris HCl	20 mM	100 mM
NaCl	200 mM	150 mM
	pH 7,40	pH 8,00

5.8.6. Proteinreinigung mittels Affinitäts-Chromatographie

Für die Reinigung von MBP-Fusionsproteinen wurde die MBP-Trap™ HP Säule (GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Diese Säule wurde durch Spülen mit 5 Säulenvolumina an MBP-Trap Puffer W äquilibriert. Der Überstand der aufgeschlossenen Zellen wurde dann über einen Spritzenfilter (Filtropur S 0.45) auf die jeweilige Säule mit 5 mL Säulenvolumen aufgetragen. Nach Durchfluss der Probe wurde die Säule mit weiteren 10 Säulenvolumina an MBP-Trap Puffer W gespült. Anschließend wurden 2 Volumina an MBP-Trap Puffer W, supplementiert mit 10 mM *d*-Maltose, aufgetragen und das Eluat für nachfolgende Schritte aufgefangen.

Für die Reinigung von Strep-Tag oder Twin-Strep-Tag-fusionierten Proteinen wurde die Strep-Tactin® Superflow® Säule (IBA Lifescience, Göttingen) eingesetzt. Die Säule wurde zunächst durch Spülen mit 2 Säulenvolumina an Streptactin Puffer W äquilibriert und anschließend der Überstand der aufgeschlossenen Zellen aufgetragen. Nach Durchlauf des Überstandes wurde die Säule mit 5 Säulenvolumina an Streptactin Puffer W gespült. Schließlich wurden mittels 2 Säulenvolumina Streptactin-Puffer W, supplementiert mit 2,5 mM *d*-Desthiobiotin, eluiert. Zur Regeneration wurde die Säule mit 2 Säulenvolumina an Streptactin Puffer R gespült und schließlich solange Streptactin Puffer W aufgetragen, bis die Säule entfärbt war.

5.8.7. Konzentrierung von Proteinlösungen

Das eluierte Protein wurde bei Bedarf mittels des Pierce™ Protein Concentrator (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) konzentriert. Hierzu wurde das Eluat in den Konzentrierer gefüllt und bei 1800 rcf bei 4 °C solange zentrifugiert, bis das Volumen auf 2 mL verringert war, oder die Proteinkonzentration mehr als 2 mg/mL betrug.

5.8.8. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Zellsuspensionen wurde mittels der Biuret-Methode bestimmt [33]. Die Proteinkonzentration wurde nach Formel

$$c[\text{Protein}] = \frac{E_{546,b} - E_{546,a}}{d * 0,266 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \quad (3)$$

$E_{546,a}$ steht für die Absorption der Probe vor Zugabe von Kaliumcyanid, $E_{546,b}$ für die Absorption nach Zugabe von Kaliumcyanid, d für die Küvettentiefe. $0,266 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ entspricht dem Extinktionskoeffizienten bei 546 nm. Für die Bestimmung der Konzentration gereinigter Proteine wurde nach einer Abwandlung der Bradford-Methode mit dem ROTI®-Nanoquant-Kit (Carl Roth, Schwerte) verwendet [34].

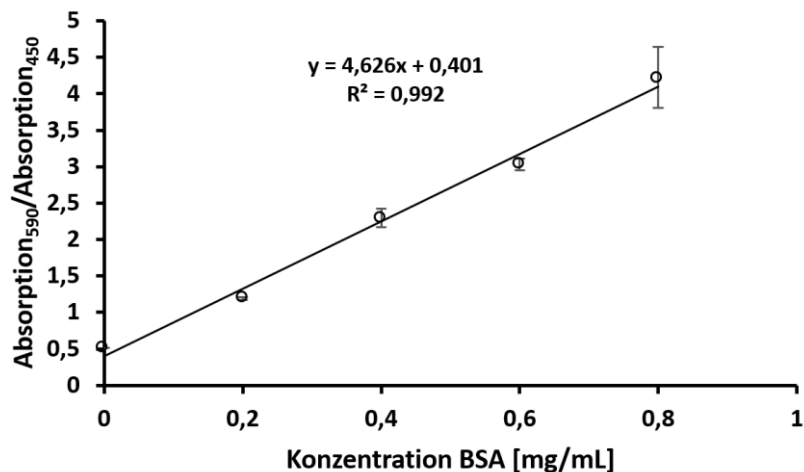


Abbildung 8. Kalibriergerade der Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode. BSA wurde in bekannten Konzentrationen vorgelegt und der jeweils resultierenden Absorption bei 593 nm zugeordnet. Jeder Wert wurde mithilfe von 3 technischen Replikaten ermittelt.

5.9. Proteinanalytische Methoden

5.9.1. Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE

Die Auftrennung von denaturierten Proteinen nach ihrer molekularen Masse wurde anhand der SDS-PAGE durchgeführt [35]. Für SDS-PAGE wurden eine zuvor bestimmte Menge an Protein einer Reinigung oder Zellsuspension in SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C aufgeschlossen. Anschließend wurde die Probe in eine Tasche im Sammelgel aufgetragen und bei 50 V pro Gel solange aufgetrennt, bis die blaue Indikatorbande des Probenpuffers das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.

Tabelle 16. Zusammensetzung des Sammel- und des Trenngels der SDS-PAGE (1,5 mm Dicke, pro zwei Gele).

	Sammelgel	Trenngel (12,5 %)
30 % (w/v) Polyacrylamid	1 mL	6,25 mL
dH ₂ O	3,4 mL	5,75 mL
Puffer	1,5 mL Sammelgelpuffer	3,75 mL Trenngelpuffer
10 % (w/v) SDS	60 µL	150 µL
TEMED	20 µL	25 µL
APS	20 µL	50 µL

Tabelle 17. Zusammensetzung der Puffer für die SDS-PAGE [36].

Sammelgelpuffer		Trenngelpuffer	
Tris HCl	500 mM	Tris HCl	1,5 mM
	pH 6,8		pH 8,8

Laufpuffer		Probenpuffer	
Tris	250 mM	Tris HCl	250 mM
Glycin	1,92 M	SDS	3,47 mM
SDS	34,7 mM	Bromphenolblau	11,9 µM
	pH 8,3	Glycerin	4 mL/L
		β-ME	2,86 M
			pH 6,8

5.9.2. Anfärben von Proteinen mittels Coomassie G250

Nach Auftrennung von Proteinen in einem SDS-Gel wurden diese mittels saurem Coomassie G250 gefärbt. In der hierfür hergestellten Färbelösung wurden 80 mg Coomassie G250 in 1 L dH₂O durch 2-stündiges Rühren gelöst und anschließend mit 2 mL 38 % (w/v) HCl-Lösung angesäuert. Vor der Färbung wurde das SDS-Gel in ein Wasserbad gelegt und gerade bis zum Sieden in einer Mikrowelle erhitzt, dann für 5 min inkubiert. Danach wurde es in die Färbelösung gelegt und erneut wie oben erhitzt. Anschließend wurde es für 30 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Färbelösung wurde durch dH₂O ausgetauscht und das Gel bis zum Erreichen des gewünschten Kontrasts entfärbt.

5.9.3. Häm-Färbung nach Francis und Becker

Zur Detektion von Häm c nach Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE wurde das Gel zunächst für 15 min in 12,5 % (w/v) TCA inkubiert. Danach wurde es dreimal für je 10 min in dH₂O gewaschen. Die Detektion erfolgte modifiziert nach der Methode von Francis und Becker [37]. Hierzu wurde es zunächst für 2 min in 50 mL einer Lösung aus 3 mM Dianisidin*2HCl inkubiert, anschließend wurden 5 mL 0,5 M Natriumcitrat und 1 mL einer 30 % (w/v) Wasserstoffperoxid-Lösung hinzugegeben. Das Gel wurde bis zur guten Sichtbarkeit des entstehenden Chromophors (ca. 30 min) geschwenkt und anschließend durch Scannen digital dokumentiert.

5.9.4. Western Blot von separierten Proteinen

Mittels Western Blot wurden die zuvor durch SDS-PAGE getrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Bio-Rad, München) übertragen. In einer Transfer-Kassette (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad, München) wurden 4 Lagen von in Anodenpuffer I getränktem Whatman-Papier gelegt und zwei Lagen in Anodenpuffer II getränktem Whatman-Papier darüber platziert (Tabelle 18). Die Nitrocellulose-Membran wurde kurz in Anodenpuffer II getaucht, auf das Whatman-Papier gelegt und das Gel darauf gedrückt, sodass keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Anschließend wurden 4 Lagen in Kathodenpuffer getränktes Whatman-Papier darübergerlegt und die Kassette geschlossen. Der Transfer erfolgte mit 8 V und 400 A/m². Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran in eine Lösung mit 5 % (w/v) BSA in PBS gelegt und mindestens 2 h oder über Nacht inkubiert.

Tabelle 18. Zusammensetzung der Puffer für die Übertragung von Proteinen aus dem SDS-PA-Gel auf die Nitrocellulose-Membran.

Anodenpuffer I		Kathodenpuffer	
Tris HCl	300 mM	Tris HCl	25 mM
Methanol	20 % (v/v)	Aminohexansäure	40 mM
	pH 10,4	Methanol	20 % (v/v)
Anodenpuffer II			pH 10,4
Tris HCl	25 mM		
Methanol	20 % (v/v)		
	pH 10,4		

Tabelle 19. Zusammensetzung von PBS für den Western Blot sowie die Immunodetektion. Im Fall von PBST wurden zusätzlich 5 μ L/L Tween-20 zugesetzt.

PBS	
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
	pH 7,40

5.9.5. Immunodetektion von affinitätsgetagten Proteinen

Die Membran wurde in PBS gelegt und für 15 min unter Schwenken inkubiert. Zur Detektion von Streptactin-Tag-fusionierten Proteinen wurde entweder der monoklonale Streptactin-Antikörper oder Streptactin (beides von IBA Lifesciences) in einer 1:4000-Verdünnung in PBS verwendet, zur Detektion von MBP-fusionierten Proteinen der monoklonale Anti-MBP Monoclonal Antibody (New England Biolabs, Frankfurt am Main) in einer 1:2000-Verdünnung. Beide Antikörper waren mit der HRP konjugiert. Die Membran wurde in die entsprechende Antikörperlösung gelegt und für 1 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach wurde sie dreimal für 1 min mit PBS, sowie einmal für 1 min in PBST (Tabelle 19) unter Schwenken gewaschen. Das PBST wurde durch PBS und nach 1 min Inkubation durch die Detektionslösung (100 mg 4-Chloro-1-Naphthol gelöst in 5 mL 99,8 % (v/v) Ethanol ausgetauscht. Es wurden

200 μL 30 % (w/v) Wasserstoffperoxid-Lösung hinzugegeben und die Membran bis zur klaren Sichtbarkeit der Signale inkubiert, dann mit dH_2O abgespült und schließlich wie die gefärbten SDS-Gele gescannt.

5.9.6. Kolorimetrische Eisen-Bestimmung

Der Eisengehalt von Proteinen wurde durch Komplexierung mit TPTZ nach Collins et al. [38] bestimmt. 100 μL der zu analysierenden Probe wurden mit dH_2O auf 800 μL aufgefüllt und anschließend mit 100 μL 8 M HCl versetzt. Nach 10 min bei RT wurden 100 μL 80 % (w/v) TCA addiert und der Ansatz für weitere 10 min inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend bei 13.100 rcf für 10 min bei RT zentrifugiert. 800 μL des Überstandes wurden entnommen und zuerst mit 250 μL 75 % (w/v) NH_4Ac neutralisiert, dann mit 100 μL 10 % (w/v) Hydroxylamin-Hydrochlorid und schließlich 100 μL 4 mM TPTZ in 10 mM HCl zur Detektion versetzt. Die Konzentration des resultierenden Fe(II)-TPTZ-Komplexes wurde bei 593 nm gegen einen Reaktionsansatz ohne eisenhaltige Probe bestimmt. Vor der Bestimmung des Eisengehaltes einer Probe wurde eine Kalibrierung mit FeCl_3 durchgeführt (Tabelle 8).

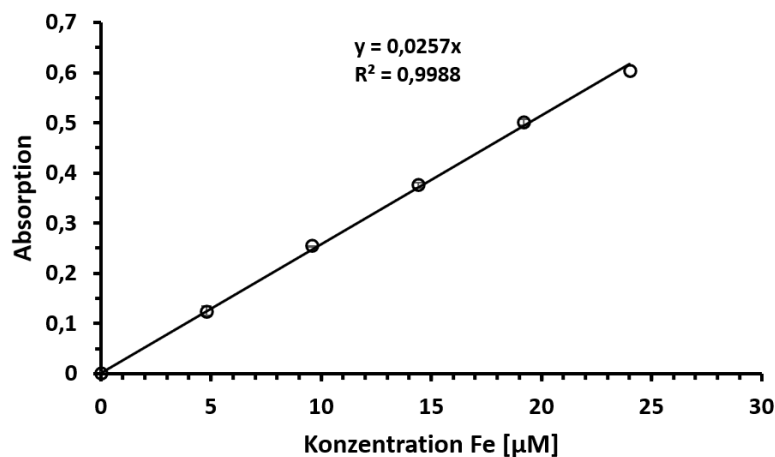


Abbildung 9. Kalibriergerade der Eisenbestimmung mit der TPTZ-Methode. FeCl_3 wurde in bekannten Konzentrationen vorgelegt und der jeweils resultierenden Absorption bei 593 nm zugeordnet. Jeder Wert wurde über 3 technische Replikate ermittelt.

5.9.7. Aufnahme von UV/Vis-Spektren von MccA

Gereinigtes und konzentriertes MccA wurde in Streptactin-Waschpuffer auf eine Konzentration von 0,3 mg/mL verdünnt bzw. bis die Absorption der β -Bande unterhalb von 1 lag. Von der Probe wurde ein UV/Vis-Spektrum von 200 nm bis 700 nm aufgenommen (wie isoliert/oxidiert). Danach wurde Natriumdithionit bis zum Farbumschlag der Probe gegeben und erneut ein Spektrum aufgenommen (reduziert).

5.9.8. Bestimmung der Häm *c*-Konzentration

Die Konzentration an Häm *c* wurde anhand der UV/Vis-Spektren von oxidiertem und reduziertem MccA nach der folgenden Formel bestimmt:

$$c[\text{Häm } c] = \frac{A_{red} - A_{ox}}{d * 19,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \quad (4)$$

$$A_{red/ox} = A_{550,red/ox} - A_{540,red/ox} \quad (5)$$

$A_{red/ox}$ bezieht sich auf die Differenz der Absorption der reduzierten oder der oxidierten Probe, die Küvettentiefe und $19,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ist der korrespondierende Extinktionskoeffizient [97].

A_{550} bezieht sich auf die Absorption bei 550 nm, A_{540} auf die entsprechende Absorption bei 540 nm.

5.9.9. Gelfiltration von MccA

MccA-twS, MccA_C399A-twS, MccA_C495A-twS und MccA_C399A_C495A-twS wurden anaerob gereinigt und anschließend zur Unterscheidung von Oligomerisierungs-Zuständen mittels Gelfiltration auf einer Sephadex S200 26/600-Säule getrennt. Als Puffer diente 50 mM Tris und 150 mM NaCl pH 7,5. Für die Zuordnung der Massen von Proteinmono- oder -Oligomeren wurden solche mit bekannter Masse auf die Säule aufgetragen und deren Elutions-Volumina zugeordnet (Tabelle 9).

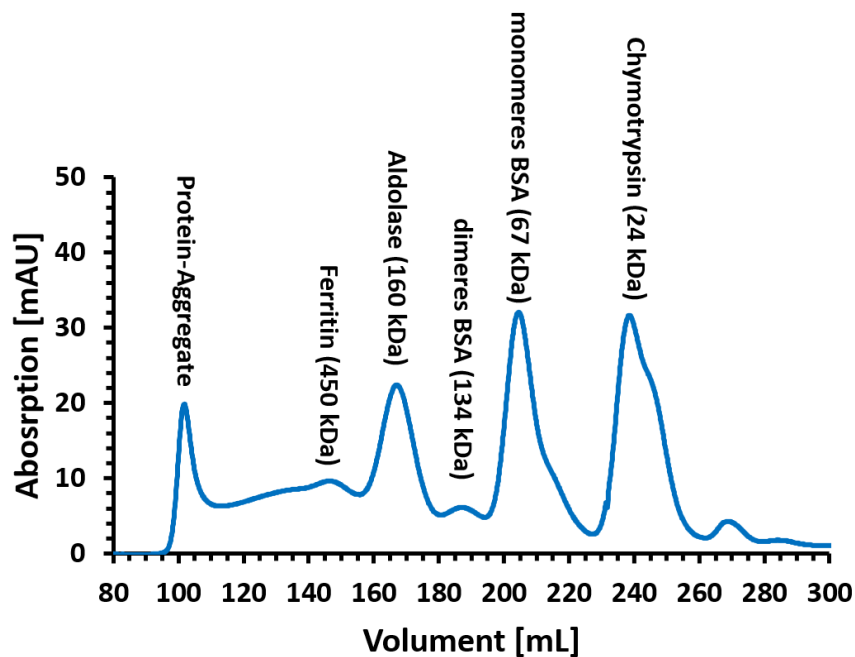


Abbildung 10. Kalibrierung der Sephadex S200 26/600-Säule mit Proteinen und Proteinkomplexen bekannter Massen.

5.9.10. Cyclovoltammetrische Charakterisierung von MccA

Gereinigtes MccA-twS und MccA_C399A-twS wurden nach Gelfiltration mittels Cyclovoltammetrie untersucht. Hierzu wurde Protein auf einer Graphitelektrode immobilisiert und zyklische Voltammetrie ohne Substrat, oder mit steigenden Konzentrationen von Sulfit oder Nitrit durchgeführt. Außerdem wurden Cyclovoltammogramme der Elektrode ohne Proteinfilm aufgezeichnet. Aus den Cyclovoltammogrammen mit und ohne Proteinfilm wurden Differenzspektren berechnet.

5.9.11. Chronoamperometrische Charakterisierung von MccA

Die chronoamperometrische Charakterisierung von MccA wurde wie die cyclovoltammetrische Charakterisierung von Daniel Tekverk durchgeführt. MccA wurde ebenfalls an einer Graphit-Elektrode fixiert und bei einer konstanten Spannung von -456 mV schrittweise steigende Konzentrationen an entweder Sulfit oder Nitrit zugegeben. Hierauf wurde die Stromstärke abhängig von der zugegebenen Substrat-Konzentration gemessen.

5.9.12. Rekonstitution von MBP-TEV-MccC-Strep mit [4Fe4S]-Zentren

Gereinigtes MBP-TEV-MccC-Strep wurde nach einem Protokoll von [39] mit [4Fe4S]-Zentren rekonstituiert. Alle Schritte wurden mit sauerstofffreien Lösungen unter 97,5 % N₂ und 2,5 % H₂ durchgeführt. 1 mL Probe mit zwischen 2 mg/mL und 5 mg/mL Protein wurde auf eine PD-10-Säule (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) gegeben und in 1 mL FeS-Rekonstitutionspuffer (50 mM Tris HCl, 5 mM DTT, pH 8,0) überführt. Es wurden 5 µL β-ME hinzugegeben und gemischt. Anschließend wurden abwechselnd je 1 µL 300 mM (NH₄)Fe(II)SO₄ und 300 mM Na₂S zugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde solange mit den Lösungen titriert, bis die Schwarzfärbung das Auftreten von überschüssigem FeS anzeigte. Der Ansatz wurde mit 16.100 rcf bei 4 °C für 10 min zentrifugiert, um Präzipitat abzuscheiden. Das Protein im Überstand wurde mittels Affinitätschromatographie mit einer Streptactin-Säule gereinigt. Anschließend wurde vom Protein ein weiteres UV/Vis-Spektrum gegen Streptactin-Puffer E aufgenommen sowie der Eisengehalt quantifiziert.

5.9.13. Bestimmung des Kupfergehaltes mit 2,2'-Bichinolin

Die Kupferkonzentration wurde durch Komplexierung mit 2,2'-Bichinolin unter reduzierenden Bedingungen bestimmt [40][41]. 500 µL der Probe mit einer Proteinkonzentration zwischen 0,5 mg/mL und 2 mg/mL wurden mit 500 µL Bichinolin-Lösung (100 µM in Dimethylformamid) gemischt, fünfmal invertiert und für 10 min inkubiert. Anschließend wurde OD₅₆₄ gegen eine Mischung von 500 µL dH₂O und 500 µL Bichinolin-Lösung bestimmt. Vor der Kupfer-Bestimmung der Proben wurde eine Kalibrierung mit CuCl₂ durchgeführt (Abbildung 11).

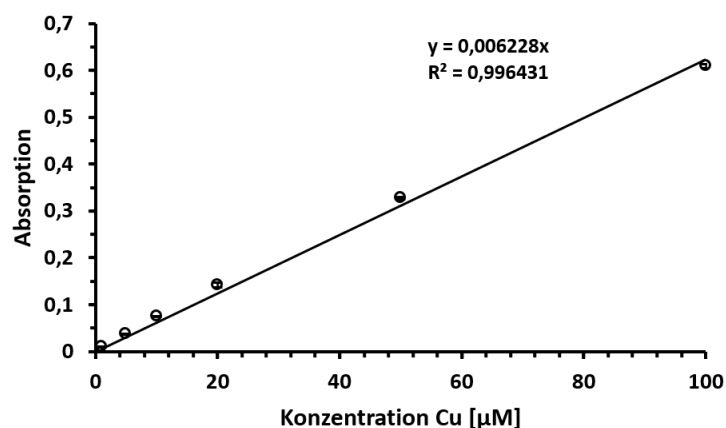


Abbildung 11. Kalibriergerade der Kupferbestimmung mittels 2,2'-Bichinolin. CuCl₂ wurde in bekannten Konzentrationen vorgelegt und der jeweils resultierenden Absorption bei 564 nm zugeordnet. Jeder Wert wurde über 3 technische Replikate ermittelt.

5.9.14. Rekonstitution von MccL mit Cu(I)

MccL wurde nach einem abgewandelten Protokoll von Ralle et al. [42] bei 4 °C unter Schutzatmosphäre rekonstituiert. 2 mL Probe (Konzentration zwischen 0,5 und 1 mg/mL MccL) wurde zunächst mit DTT mit einer Endkonzentration von 1 mM für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe in einem Dialyseschlauch aus regenerierter Zellulose (Cole Parmer, Wertheim) über Nacht gegen Rekonstitutionspuffer 1 dialysiert (Tabelle 20). Der Schlauch wurde einseitig geöffnet und insgesamt 20 µL einer 5 mM TACH-Lösung in Volumina von je 5 µL über 10 min zugefügt. Der Ansatz wurde im Folgenden zuerst für 5 h gegen Rekonstitutionspuffer 2, dann über Nacht gegen Rekonstitutionspuffer 3 dialysiert.

Tabelle 20. Zusammensetzung der Puffer für die Rekonstitution von MccL.

Rekonstitutionspuffer 1		Rekonstitutionspuffer 3	
HEPES	50 mM	HEPES	50 mM
Acetonitril	10 % (v/v)		
	pH 8,0		pH 8,0
Rekonstitutionspuffer 2			
HEPES	50 mM		
Acetonitril	5 % (v/v)		
	pH 8,0		

5.10. Charakterisierung der Mcc-abhängigen Sulfitatmung

5.10.1. Aufnahme des Wachstums von *W. succinogenes*

10 mL einer in der vorherigen Nacht vermehrten Vorkultur der jeweiligen *W. succinogenes*-Mutante wurden zur Inokulierung von auf 37 °C vorgewärmtes Medium verwendet. Es wurde von jeder Vorkultur so viel hinzugegeben, dass eine OD₅₇₈ von 0,05 erreicht wurde. Für jede Messung wurde eine Probe von 900 µL abgenommen, 800 µL wurden für die Messung der OD₅₇₈ verwendet, 100 µL wurden bei -20 °C für die Bestimmung der Metabolite gelagert. Die Kultur wuchs bei 37 °C ohne Schütteln und für die folgenden 10 h einmal pro Stunde eine weitere Probe entnommen, mit welcher wie oben verfahren wurde. Vor Abschluss des Experimentes wurde nach 24 h eine letzte Probe genommen. Zur Untersuchung der Sulfitatmung des *W. succinogenes*-Wildstamms wurden zwei Formiat-Fumarat-Sulfit-Medien um 10 h zeitversetzt

wie oben beschrieben inokuliert. Das Wachstum wurde parallel für diese Kulturen aufgenommen und anschließend in einem Graphen vereinigt. Für *W. succinogenes* DSM1740, jede Mutante und jede Wachstumsbedingung wurden drei biologische Replikate eingesetzt.

Für die Bestimmung der Verdopplungszeit in min in der exponentiellen Phase wurde die Verdopplungszeit zwischen je zwei gemessenen Werten t_n und t_{n+1} mithilfe der folgenden Formel berechnet:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{(\ln(t_{n+1}) - \ln(t_n))} * 60 \text{ min} \quad (6)$$

Die jeweils geringste Verdopplungszeit im Zeitfenster von 2 h bis 6 h nach Inokulieren wurde als die Verdopplungszeit der jeweiligen Kultur bestimmt. Aus drei biologischen Replikaten wurde die durchschnittliche Verdopplungszeit sowie dessen Standardabweichung für den jeweiligen Stamm oder die jeweilige Mutante bestimmt.

5.10.2. Messung des Elektronentransportes zwischen Formiat und Sulfit

Für die Bestimmung der Elektronentransport-Aktivität wurde eine 500 mL Kultur in Formiat-Fumarat-Sulfit- oder Formiat-Sulfit-Medium bis zum Erreichen der frühen stationären Phase (nach etwa 8 bis 10 h) vermehrt. Die Zellen wurden anaerob bei RT für 10 min bei 5000 rpm geerntet und in 10 mL ETA-Waschpuffer resuspendiert (Tabelle 21). Die Zellen wurden erneut wie oben gewaschen und anschließend in 5 mL ETA-Assaypuffer aufgenommen (100 X Zellsuspension). Es wurden pro biologischem Replikat drei Ansätze mit 920 μL ETA-Assaypuffer und unterschiedlicher Konzentration der Zellsuspension vorbereitet (20 X, 10 X, 5 X). Zu den auf 37 °C warmen technischen Replikaten wurden je 40 μL 1 M Formiat-Lösung und 40 μL 250 mM Natriumsulfit-Lösung zugegeben. Die Ansätze wurden bei 37 °C und 550 rpm inkubiert und alle 5 min 50 μL Probe entnommen, zuerst auf Eis und nach Beenden des Experimentes bei -20 °C bis zur Bestimmung der Metabolite gelagert.

Tabelle 21. Zusammensetzung der Puffer für die Messung des Elektronentransportes

ETA-Waschpuffer		ETA-Assaypuffer	
Tris HCl	100 mM	Tris HCl	50 mM
Saccharose	300 mM	Saccharose	300 mM
	pH 7,3		pH 7,3

5.10.3. Bestimmung der Sulfit-Konzentration

Die Sulfit-Konzentration wurde nach einem abgewandelten Protokoll von Pachmeyer bestimmt [43]. 800 μL Probe mit einer Sulfitkonzentration von bis zu 100 μM wurde mit 100 μL Fuchsin-Reagenz gemischt und für 10 min inkubiert. Anschließend wurden 10 μL 30 % (v/v) Wasserstoffperoxid-Lösung hinzugegeben und der Ansatz mehrmals invertiert. Nach 90 min wurde die OD_{570} gegen eine Mischung aus 800 μL dH_2O , 100 μL Fuchsin-Reagenz und 10 μL der Formaldehydlösung als Blindwert gemessen. Vor Bestimmung der Sulfit-Konzentration wurde eine Kalibrierung mit Na_2SO_3 durchgeführt (Abbildung 12).

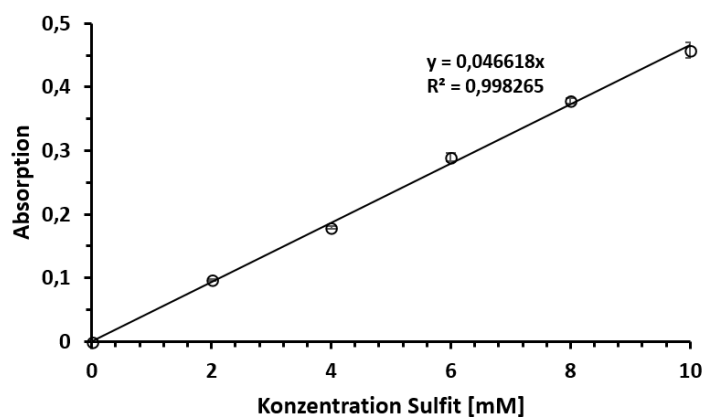


Abbildung 12. Kalibriergerade der Sulfitbestimmung. Na_2SO_3 wurde in bekannten Konzentrationen vorgelegt und der jeweils resultierenden Absorption bei 570 nm zugeordnet. Jeder Wert wurde über 3 technische Replikate ermittelt.

5.10.4. Bestimmung der Sulfid-Konzentration

Die Bestimmung der Sulfid-Konzentration wurde nach King und Morris durchgeführt [44]. 350 μL der Probe mit bis zu 100 μM Sulfid wurde zu 250 μL vorgelegter Zinkacetat-Lösung gegeben. Es wurden 125 μL DMPD-Lösung sowie 50 μL FeCl_3 -Lösung zugegeben, gründlich gemischt und die OD_{665} nach 90 min Inkubation gegen ebendiesen Ansatz ohne Sulfid gemessen. Vor Bestimmung der Sulfid-Konzentration wurde eine Kalibrierung mit Na_2S durchgeführt (Abbildung 13).

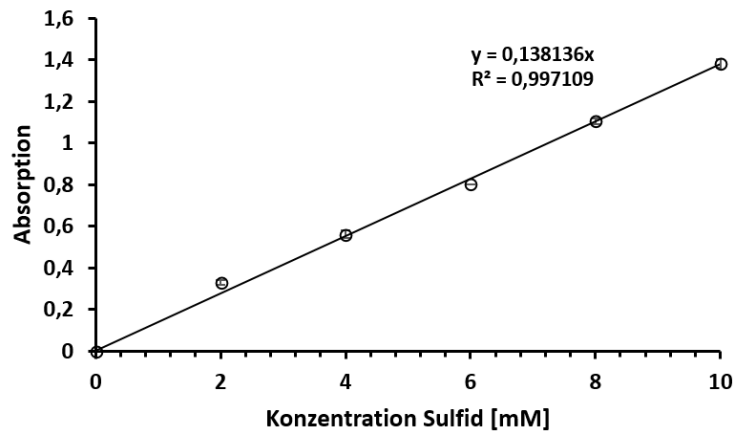


Abbildung 13. Kalibriergerade der Sulfidbestimmung. Na_2S wurde in bekannten Konzentrationen vorgelegt und der jeweils resultierenden Absorption bei 655 nm zugeordnet. Jeder Wert wurde über 3 technische Replikate ermittelt.

5.10.5. Bestimmung der Formiat-Konzentration

Die Formiat-Konzentration wurde nach einem Protokoll von Bergmeyer bestimmt [45]. $20 \mu\text{L}$ der Probe mit bis zu $500 \mu\text{M}$ Formiat wurden zu $500 \mu\text{L}$ 150 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 gegeben. Es wurden $60 \mu\text{L}$ 20 mM NAD^+ -Lösung und $5 \mu\text{L}$ Formiatdehydrogenase-Lösung (100 U/mL in Kaliumphosphatpuffer) hinzugefügt, der Ansatz gut gemischt und bei 37°C inkubiert. Nach 90 min Inkubation wurde die OD_{366} gegen einen Ansatz mit $20 \mu\text{L}$ dH_2O anstelle von Probe gemessen. Vor der Bestimmung der Formiat-Konzentration der Proben wurde eine Kalibrierung mittels Natrium-Formiat durchgeführt (Abbildung 14).

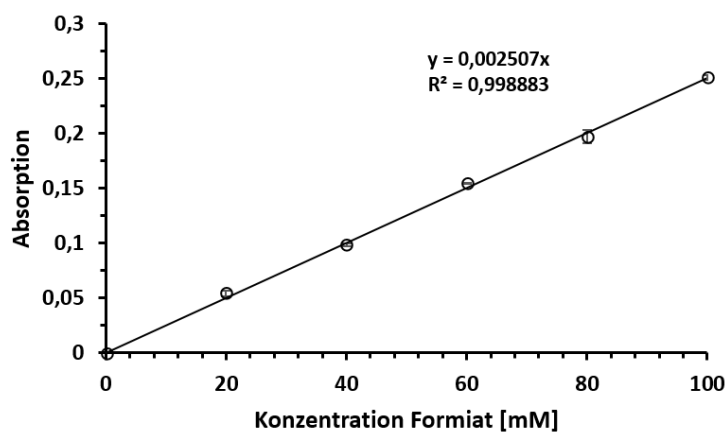


Abbildung 14. Kalibriergerade der Formiatbestimmung. Natriumformiat wurde in bekannten Konzentrationen vorgelegt und der jeweils resultierenden Absorption bei 366 nm zugeordnet. Jeder Wert wurde über 3 technische Replikate ermittelt.

5.10.6. Bestimmung der Anteile von Menachinon und 8-Methylmenachinon

Menachinone wurden aus der *W. succinogenes*-Membran wie zuvor beschrieben mithilfe von Petrolbenzin (60–70), Ethanol und Aceton extrahiert [23][25]. Nach der Extraktion wurden die erhaltenen Menachinone in Methanol/Isopropanol (70 zu 30 %) gelöst und mittels *Reverse Phase* HPLC (OmniSpher 5 C18 150×4.6mm Säule (Agilent, Ratingen) mit dem Hitachi LaChrom Elite-System) getrennt. Als Elutionsmittel diente Methanol. Die Elutionsrate betrug 1 mL/min. Der Nachweis von eluierten Menachinonen erfolgte mittels UV-Detektion mit einer L-2450-Diode.

5.11. Bioinformatische Methoden

5.11.1. Modellierung der Tertiär- und Quartärstrukturen von MccC und MccD

Die hypothetischen Tertiärstrukturen von MccC und MccD wurden mithilfe von I-Tasser [46] modelliert. Die Sequenz von MccC Δ 1-32 (ohne die Signalsequenz für den Export in das Periplasma) und MccD wurden einzeln auf den I-Tasser-Server [<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>; zuletzt am 09.08.2019 besucht] geladen und durch den I-Tasser-Algorithmus verschiedenen potenziellen Tertiärstrukturen zugeordnet. Von den 5 ausgegebenen simulierten Modellen für je MccC Δ 1-32 bzw. MccD wurde für die Untersuchung der putativen Tertiärstruktur das Modell 1 (besaß den höchsten C-Score) verwendet. Die Strukturen der beiden Proteine wurden von I-Tasser anhand des PsrABC-Komplexes von *Thermus thermophilus* mit gebundenem MK7 modelliert (Struktur 2VPW in der Protein Data Bank, [47]). Die 4 Sequenzen der von I-Tasser ausgegebenen Strukturen von MccC Δ 1-32 mit jeweils einem [4Fe4S]-Zentrum wurden zusammen mit PyMol V1.3 geladen. Anschließend wurden die 4 Strukturen aneinander ausgerichtet und die 4 Kofaktoren einer dieser ansonsten identischen Strukturen zugeordnet, was in einer MccC-Struktur mit allen 4 [4Fe4S]-Zentren resultierte. Im Folgenden wurden die Strukturen von MccC Δ 1-32 und MccD in PyMol zusammen mit der empirischen Struktur des PsrBC-Komplexes geladen. Die Struktur von MccC Δ 1-32 wurde an PsrB, die Struktur von MccD and PsrC ausgerichtet.

5.11.2. Phylogenetische Analyse von MccA

Die Sequenz von *W. succinogenes* MccA Δ 1-21 (ohne Sec-Exportsequenz) wurde mittels BLASTp [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>; zuletzt am 13.08.2019 besucht] mit der NCBI-Datenbank verglichen. Nach dem Vergleich wurden alle Sequenzen mit mehr als 25 % gleichen Aminosäure-Positionen (mindestens 25 % Sequenzidentität) als MccA-Homologe definiert. Von diesen wurden anschließend alle Sequenzen ausgewählt, welche über 7 CXXCH- und ein zusätzliches CX₁₅CH- oder CX₁₇CH-Motiv verfügen, ausgewählt. Diese wurden um ihre vorausgesagte Signalsequenz trunziert, in ClustalX 2.1 geladen und verglichen (Funktion complete alignment). Die vom Server vorgegebenen Parameter für den Vergleich wurden nicht verändert. Mithilfe der ermittelten Sequenzähnlichkeiten zwischen den Homologen wurde mit ClustalX ein phylogenetischer Baum erstellt. Dieser wurde mittels ITOL [<https://itol.embl.de>; zuletzt am 13.08.2019 besucht] visualisiert und die Sequenzen anhand der Bakterienklasse des Organismus, aus welchem sie stammt, eingefärbt.

5.11.3. Vergleich von MccC-Homologen

Die *mccC*-Gene, welche auf den *mcc*-Genclustern lagen, wurden identifiziert und mittels der NCBI-Datenbank deren Proteinsequenzen zugeordnet. Von den insgesamt 138 Einträgen resultierten nach Abzug von 3 Pseudogenen und 25 redundanten, also von unterschiedlichen Genen auf denselben Einträgen 110 MccC-Sequenzen. Diese wurden mittels ClustelW2 mit den standardmäßig vorgegebenen Parametern verglichen.

5.11.4. Identifikation von *mcc*-Genclustern

Aus den in der NCBI-Datenbank hinterlegten Genome bakterieller Isolate wurden die stromaufwärts und stromabwärts der MccA-Homologe liegenden Gene identifiziert. Sofern sie entweder Homologe zu den anderen in *W. succinogenes* *mcc*-Gencluster kodierten Genen oder zwischen den Genomen der Isolate konserviert waren, wurden sie zu einem *mcc*-Gencluster zusammengefasst. Jedes so identifizierte Gencluster wurde der Bakterienklasse des Isolates zugeordnet. Sofern mehrere Gencluster zueinander syntäne Bereiche aufwiesen, wurden sie in Typen zusammengefasst.

6. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

6.1. Das Zweikomponentensystem MccRS

6.1.1. Deletion von *mccRS*

Wie in der Einleitung erläutert, bilden die Genprodukte von *mccR* und *-S* ein hypothetisches Zweikomponentensystem, mit dessen Hilfe das *mcc*-Gencluster abhängig von Sulfit induziert werden könnte. Zur Kontrolle, ob *W. succinogenes* ohne diese Gene zur Sulfitatmung in der Lage ist, wurden diese in der Mutante *W. succinogenes* $\Delta mccRS::kan$ durch eine Kanamycin-Resistenzgen-Kassette ersetzt (Abbildung 15).

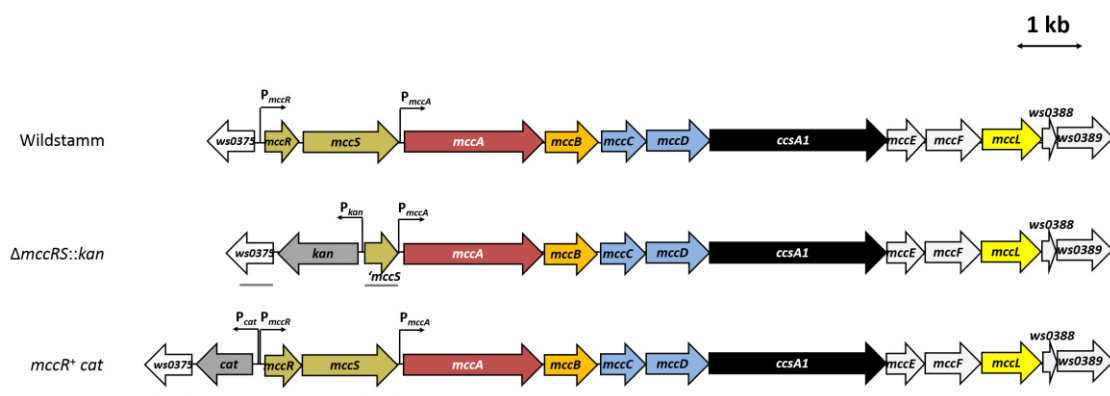


Abbildung 15. Karte der *mcc*-Gencluster des *W. succinogenes* Wildstammes, von *W. succinogenes* $\Delta mccRS::kan$ und von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *cat*. Graue Linien unter den Leserahmen zeigen den Bereich der Rekombination mit dem passenden Plasmid, welches für die Erstellung der entsprechenden Mutante verwendet worden war (siehe Kap. 5.2.2 und 5.7.2).

Das Wachstum und die Fähigkeit zur Sulfitreduktion von Kulturen des Wildstammes sowie der Mutante wurde auf Medium mit 100 mM Formiat als Elektronendonator sowie einer Mischung aus 45 mM Fumarat und 10 mM Sulfit als Elektronenakzeptoren untersucht (im Folgenden als Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium bezeichnet, Näheres in Kap. 5.4.1). Kulturen des Wildstammes als auch der Mutante erreichten innerhalb der ersten 8 h nach Inokulieren die stationäre Phase, wobei die optische Dichte bei 578 nm (OD_{578}) von *W. succinogenes* $\Delta mccRS::kan$ zu diesem Zeitpunkt nicht ganz die OD_{578} des Wildstammes erreichte (Abbildung 16A). Kulturen des Wildstammes zeigten ein biphasisches Wachstum mit einem zweiten Zuwachs zwischen 24 h und 35 h nach Inokulieren, während für *W. succinogenes* $\Delta mccRS::kan$ nach Erreichen der stationären Phase kein weiteres Wachstum beobachtet wurde.

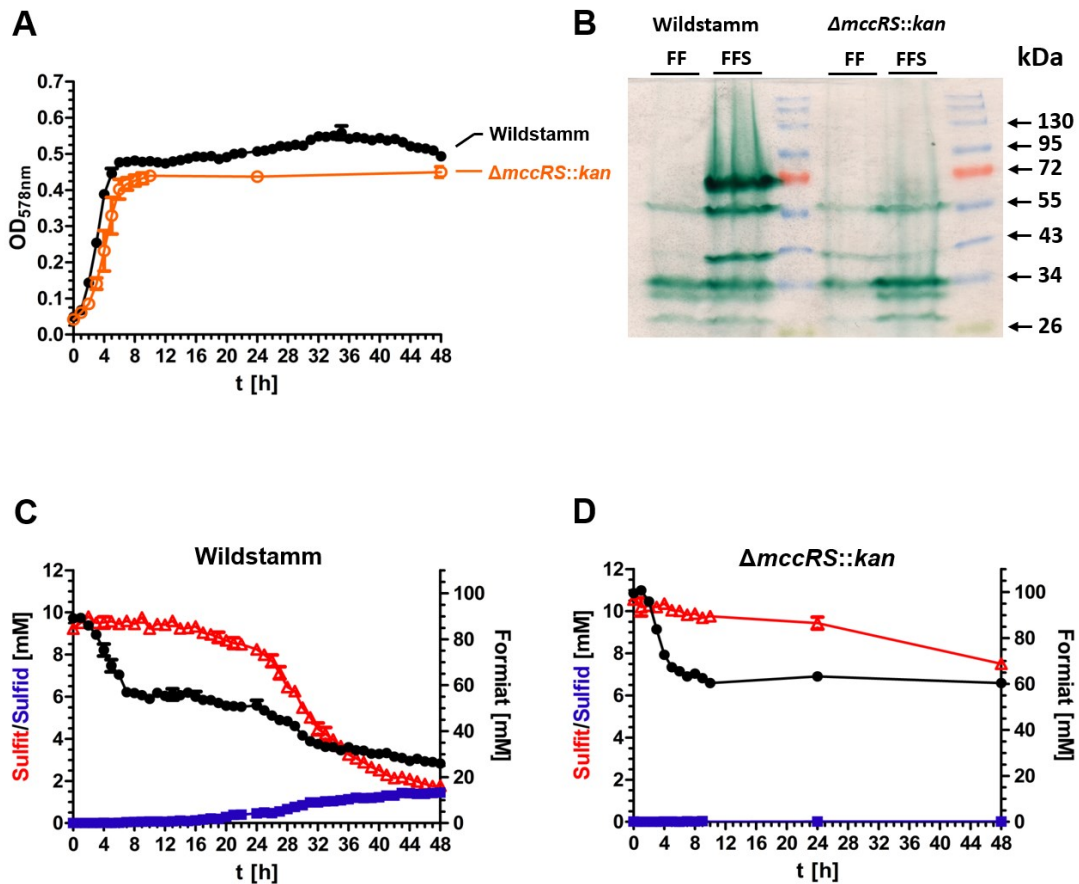


Abbildung 16. Charakterisierung der Sulfitatmung des *W. succinogenes*-Wildstammes und von *W. succinogenes* $\Delta mccRS::kan$ nach Kap. 5.10. Kulturen wurden in Medium mit Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium vermehrt. A: Wachstumskurven des Wildstammes und von *W. succinogenes* $\Delta mccRS::kan$. B: Nachweis von MccA in Abhängigkeit vom Vorhandensein von *mccR* und -S sowie von der Sulfitexposition. Der *W. succinogenes* Wildstamm sowie *W. succinogenes* $\Delta mccRS::kan$ wurden vor der Zellernte mit 45 mM Fumarat und 10 mM Sulfit (FFS) oder mit 45 mM Fumarat ohne Sulfit (FF) für 48 h vermehrt. Pro Spur wurden 150 μ g Protein an Zell-Lysat aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden Cytochrome *c* mittels Häm-Färbung detektiert. Als Proteinleiter diente die Prestained Protein Ladder P7719. C: Konzentrationen von Formiat, Sulfit sowie Sulfid der Kulturen des Wildstammes D: Konzentrationen von Formiat, Sulfit sowie Sulfid der Kulturen von *W. succinogenes* $\Delta mccRS::kan$. Für jede Messung wurden mindestens 3 biologische Replikate mit einbezogen.

Die Verdopplungszeit für die OD_{578} während dieser zweiten Wachstumsphase war signifikant geringer als die der ersten (Tabelle 22). Zur Charakterisierung der Fähigkeit zur Sulfitreduktion wurden die Konzentrationen von Formiat, Fumarat und Sulfit während des Wachstums der Kulturen gemessen. Die Sulfit-Konzentration in Kulturen des Wildstammes begann nach etwa 16 h zu sinken und lag nach 48 h bei unter 2 mM (Abbildung 16C). Beginnend hiermit wurde ein Anstieg der Sulfid-Konzentration beobachtet und nach 48 h fanden sich um die 2 mM Sulfid im Medium. Die Formiat-Konzentration sank bei Kulturen während der ersten 10 h auf 55 mM, was mit der Atmung von 45 mM Fumarat zu erklären war. Einhergehend mit dem Sulfit-

Verbrauch von Kulturen des Wildstammes sank die Formiat-Konzentration nach 48 h auf nahezu 25 mM. Somit hatten diese Kulturen während der zweiten Wachstumsphase weitere 30 mM Formiat umgesetzt. Im Gegensatz hierzu reduzierten Kulturen von *W. succinogenes* $\Delta mcrS::kan$ auch nach 48 h Inkubation kein Sulfit (Abbildung 16D) und verbrauchten insgesamt etwa 40 mM Formiat. Um zu überprüfen, ob Sulfit-Exposition für die MccA-Produktion notwendig ist, wurden Kulturen des Wildstammes auch in Medium mit 100 mM Formiat und 45 mM Fumarat, aber ohne Sulfit für 48 h inkubiert. MccA wurde anschließend mittels Häm-Färbung von zuvor elektrophoretisch aufgetrenntem Zell-Lysat nachgewiesen (Abbildung 16B). Zellen des Wildstammes mit Sulfit im Medium zeigten in der Häm-Färbung nach 48 h Inkubation MccA, während Zellen von *W. succinogenes* $\Delta mcrS::kan$ auf diesem Medium genauso wie Zellen des Wildstammes auf Medium ohne Sulfit kein nachweisbares MccA produzierten.

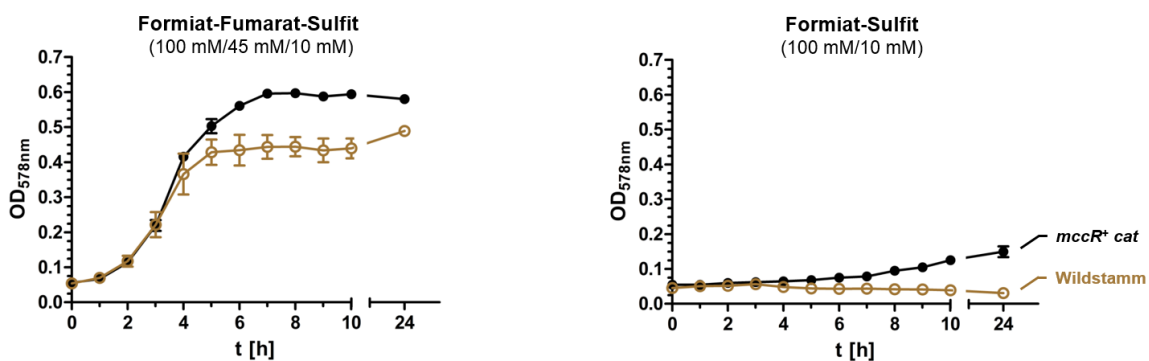
6.1.2. Verlängerung des Leserahmens von *mccR*

Das *mccR*-Gen des Wildstammes kodiert für ein Protein mit 170 Aminosäure-Resten. Im Gegensatz hierzu besitzen MccR-Orthologe anderer Epsilonproteobakterien 229 bis 231 Aminosäuren und eine zusätzliche C-terminale Domäne. Dieser beim *W. succinogenes* MccR fehlender C-Terminus ist in den Homologen als DNA-bindende Domäne (COG0745) annotiert (Abbildung 7). Nach Deletion eines Desoxyadenosin-Monophosphat-Nukleotids zwischen Position 492 und 495 in *mccR* wird von *W. succinogenes* ein längeres Protein mit einer zu den Orthologen homologen DNA-bindenden Domäne kodiert. Im Folgenden wurde eine *W. succinogenes* Mutante konstruiert, dessen Genom diesen verlängerten Leserahmen von *mccR* kodiert (Abbildung 15; *W. succinogenes* *mccR*⁺ *cat*).

Kulturen des Wildstammes sowie von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *cat* wuchsen auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium in den ersten 4 h mit vergleichbarer Verdopplungszeit und optischer Dichte (Abbildung 17). Kulturen des Wildstammes sowie von *W. succinogenes* $\Delta mcrS::kan$ erreichten anschließend zuvor beobachtet die stationäre Phase. Die OD₅₇₈ von Kulturen sowohl des Wildstammes, als auch von *W. succinogenes* $\Delta mcrS::kan$ war vergleichbar mit der OD₅₇₈ von Kulturen des Wildstammes oder von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *cat* auf Medium mit 100 mM Formiat und 45 mM Fumarat, aber ohne Sulfit (Tabelle 22). Kulturen von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *cat* wuchsen auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium hingegen auf eine etwa 0,13 höhere OD₅₇₈ als Kulturen des Wildstammes oder von *W. succinogenes* $\Delta mcrS::kan$. Kulturen von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *cat* produzierten auf diesem Medium mittels Häm-Färbung nachgewiesenes MccA (Abbildung 18). Bei Erreichen der stationären Phase hatten Kulturen dieser Mutante das

vorgelegte Sulfit komplett verbraucht und es wurden damit einhergehend etwa 7 mM Sulfid nachgewiesen. Während Kulturen des Wildstammes oder von *W. succinogenes* $\Delta mccRS::kan$ in Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium innerhalb von 10 h etwa 45 mM Formiat verbrauchten, oxidierten Kulturen von *W. succinogenes* $mccR^+ cat$ etwa 60 mM Formiat. Um den Einfluss von Fumarat als zusätzlichen Elektronenakzeptor auszuschließen, wurden Kulturen des Wildstammes sowie der Mutante in Medium mit 100 mM Formiat und 10 mM Sulfit, aber ohne Fumarat inkubiert (im Folgendem als Formiat-Sulfit-Medium bezeichnet) (Abbildung 17). Als Kohlenstoffquelle dienten hier 5 mM Succinat. In diesem Medium zeigten Kulturen des Wildstammes oder von *W. succinogenes* $\Delta mccRS::kan$ nach 24 h Inkubation kein Wachstum. Im Gegensatz hierzu wuchsen Kulturen von *W. succinogenes* $mccR^+ cat$ innerhalb von 24 h auf eine OD_{578} von 0,15, was einer Zunahme um 0,1 entsprach (Tabelle 22).

Wachstum



Metabolite

Formiat-Fumarat-Sulfit (100 mM/45 mM/10 mM)

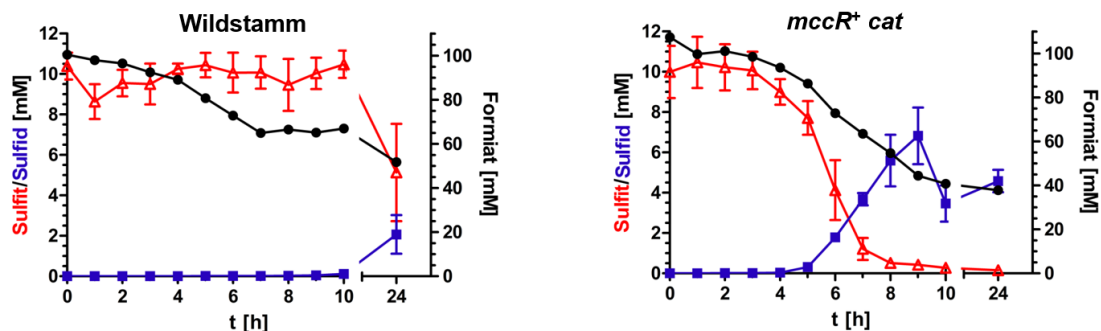


Abbildung 17. Charakterisierung des Sulfitatmung des *W. succinogenes* Wildstammes, von *W. succinogenes* $\Delta mccRS::kan$ und *W. succinogenes* $mccR^+ cat$. Kulturen wurden auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium oder in Formiat-Sulfit-Medium vermehrt.

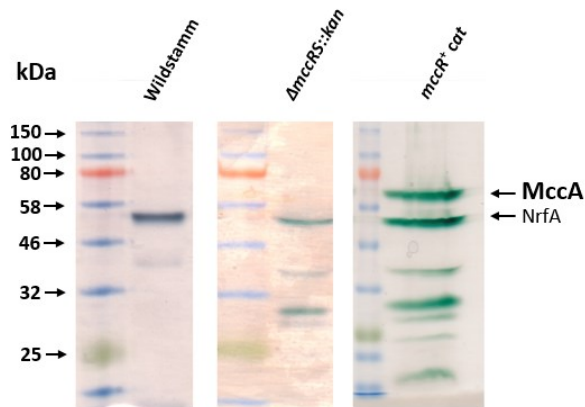


Abbildung 18. Nachweis von MccA in Zellen des Wildstammes, von *W. succinogenes* $\Delta mccRS::kan$ und von *W. succinogenes* $mccR^+ cat$. Die Kulturen wurden in Fumarat-Sulfit-Medium vermehrt und nach 10 h Wachstum geerntet. Pro Spur wurden 150 μ g Protein des Zell-Lysats aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden Cytochrome *c* mittels Häm-Färbung detektiert. Als Proteinleiter diente die Color Prestained Protein Ladder P7712 (New England Biolabs, Frankfurt am Main).

Kulturen, welche entweder auf Formiat-Fumarat-, Formiat-Sulfit, oder Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium bis zur frühen stationären Phase (etwa 10 h) gewachsen waren, wurden geerntet und von ihnen Zellsuspensionen erstellt. Diese dienten der Bestimmung der Elektronentransport-Raten zwischen dem Formiat-Dehydrogenase-Komplex und dem Mcc-System, entsprechend wurden die Umsatzraten von Formiat und Sulfit sowie die Bildungsrate von Sulfid bestimmt. Kulturen des Wildstammes wurden zum einen nach 10 h, zum anderen nach 48 h Inkubation auf Formiat-Fumarat-Sulfit geerntet und der Formiat-abhängige Sulfit-Umsatz bestimmt (Tabelle 22). Zellsuspensionen, welche aus Kulturen des Wildstammes nach Wachstum für 10 h erstellt worden waren, setzten keine Metabolite um. Im Gegensatz hierzu waren Zellsuspensionen des Wildstammes nach 48 h zur Reduktion von Sulfit und gleichzeitigen Oxidation von Formiat in der Lage. Hier korrelierten Verbrauchsdaten von $177 \pm 19 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ für Formiat und $56 \pm 6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ für Sulfit mit der Sulfid-Produktion von $45 \pm 4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$. Die Kulturen des Wildstammes zeigten nach 48 h Inkubation eine Tendenz zur Zell-Lyse, was durch eine im Vergleich zu den anderen Kulturen erhöhte Viskosität des Mediums und den Erhalt geringerer Mengen an Zellen nach Zentrifugieren deutlich wurde. Da Kulturen des Wildstammes auf Formiat-Sulfit-Medium in den ersten 10 h kein Wachstum zeigten, wurde keine Messung des Elektronentransportes durchgeführt. Kulturen des Wildstammes wuchsen auch nach 48 h Inkubation kaum. In vorangehenden Experimenten wurde aber eine OD_{578} von bis zu 0,2 und Umsatzraten von $179 \pm 74 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ für Formiat, $59 \pm 44 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ für Sulfit und $47 \pm 54 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ für Sulfid festgestellt [12]. Suspensionen von *W. succinogenes* $mccR^+ cat$ auf Formiat-Sulfit-Medium setzten $187 \pm 14 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ Formiat sowie $63 \pm 5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ Sulfit um und produzierten $51 \pm 4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ Sulfid. Suspensionen von Kulturen von *W. succinogenes* $mccR^+ cat$, welche etwa 10 h auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium gewachsen waren, setzten das vorhandene Formiat deutlich

schneller um, mit $239 \pm 20 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ für Formiat, $68 \pm 7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ für Sulfit um und produzierten dabei $63 \pm 4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ Sulfid.

Suspensionen von Kulturen von *W. succinogenes* $\Delta\text{mccRS}::\text{kan}$ zeigten korrelierend mit dem Ausbleiben von MccA keinen Metaboliten-Umsatz. Auch Zellsuspensionen, deren Kulturen zuvor auf Formiat-Fumarat-Medium vermehrt wurden, zeigten sowohl für den *W. succinogenes*-Wildstamm, als auch *W. succinogenes* mccR^+ *cat* keine Aktivität in Bezug auf Metaboliten-Umsatz. Die Verbrauchsrate von Formiat zur Verbrauchsrate von Sulfit lag zwischen 2,9:1 bis 3,0:1 (bei auf Formiat-Sulfit-Medium gewachsenen Kulturen) und 3,2:1 bis 3,5:1 (bei auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium gewachsenen Zellen). Das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Fumarat hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Umsatzraten der Zellsuspensionen von *W. succinogenes* mccR^+ *cat*.

Tabelle 22. Charakterisierung des Wachstums sowie der Sulfitatmung des *W. succinogenes*-Wildstammes, von *W. succinogenes* $\Delta\text{mccRS}::\text{kan}$ und *W. succinogenes* mccR^+ *cat* in verschiedenen Medien. Die Umsatzraten der Metabolite wurden mithilfe von Zellsuspensionen der jeweiligen Mutante gemessen (Kap. 5.10.2). Falls nicht anders angegeben, wurden Kulturen für die Bestimmung des Elektronentransportes nach etwa 10 Wachstum geerntet. Kulturen des Wildstammes wurden zum einen nach 10 h, zum anderen nach 48 h charakterisiert. Jeder Mittelwert und dessen Standardabweichung wurde mithilfe von 3 biologischen Replikaten bestimmt. ∞ bedeutet, dass Wachstum ausblieb.

Stamm/Mutante	OD ₅₇₈ in der stationären Phase ¹	Verdopplungszeit [min] ¹	Verbrauchsrate	Verbrauchsrate	Produktionsrate
			Formiat	Sulfit	Sulfid
[nmol min ⁻¹ mg Protein ⁻¹]					
Formiat-Fumarat-Sulfit (100 mM/45 mM/10 mM)					
Wildstamm 10 h	0,463 ± 0,020	65 ± 17	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Wildstamm 48 h	0,558 ± 0,032	1386 ± 291	177 ± 19 ³	56 ± 6 ³	45 ± 4 ³
$\Delta\text{mccRS}::\text{kan}$	0,450 ± 0,010	75 ± 12	< 0,1	< 0,1	< 0,1
mccR^+ <i>cat</i>	0,597 ± 0,012	63 ± 9	239 ± 20	68 ± 7	63 ± 4
Formiat-Sulfit (100 mM/10 mM)					
Wildstamm 10 h	0,053 ± 0,005	∞	n.b. ²	n.b. ²	n.b. ²
Wildstamm 48 h	≈ 0,2 ⁴	780 ⁴	179 ± 7 ⁴	59 ± 4 ⁴	47 ± 5 ⁴
$\Delta\text{mccRS}::\text{kan}$	0,054 ± 0,002	∞	n.b. ²	n.b. ²	n.b. ²
mccR^+ <i>cat</i>	0,149 ± 0,013	216 ± 59	187 ± 14	63 ± 5	51 ± 4
Formiat-Fumarat (100 mM/45 mM)					
Wildstamm	0,468 ± 0,018	69 ± 6	< 0,1	< 0,1	< 0,1
mccR^+ <i>cat</i>	0,486 ± 0,016	61 ± 6	< 0,1	< 0,1	< 0,1

¹Die maximale OD₅₇₈ und die Verdopplungszeit wurden anhand von Formel (6) in Kap. 5.10.1 berechnet.

²nicht bestimmbar, da kein Wachstum ³Zellen der Kulturen waren teilweise lysiert ⁴aus [12]

6.1.3. Diskussion

Durch Deletion von *mccR* und *-S* wurde die Notwendigkeit dieser Gene für die Induktion des *mcc*-Genclusters demonstriert. Wie in der Einleitung erläutert, wurden zuvor durchgeführte Charakterisierungen mit dem *W. succinogenes* Wildstamm durchgeführt, welcher die Mcc-Proteine stark verzögert und erst nach Verbrauch anderer Elektronenakzeptoren produziert. [12]. Aus dem Verhalten von Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ cat* leitet sich ab, dass *mccR* in der Tat einen Funktionsverlust durch die beschriebene Leserastermutation erlitten hatte, wodurch keine rasche Induktion des *mcc*-Genclusters nach Sulfitexposition stattfand. Dennoch waren Zellen des *W. succinogenes* Wildstammes trotz defektem MccR in der Lage, die Mcc-Proteine nach Wegfall alternativer Elektronenakzeptoren zu produzieren. Diese Produktion scheint aber wesentlich langsamer als die von Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ cat* unter ebendiesen Bedingungen zu sein, da die Verdopplungszeit der Wildstamm-Zellen sowohl auf Formiat-Fumarat-Sulfit, als auch auf Formiat-Sulfit-Medium deutlich größer ist als die von *W. succinogenes mccR⁺ cat*. Die Produktion von MccA und voraussichtlich auch der restlichen Mcc-Proteine ist dabei wie bei *W. succinogenes mccR⁺ cat* abhängig von Sulfit im Medium, da sich bei Kulturen des Wildstammes in Formiat-Fumarat-Medium auch nach 48 h Inkubation kein MccA nachweisen lässt (Abbildung 16 B). Die plausibelste Erklärung wäre die Induktion des *mcc*-Genclusters durch einen weiteren Sulfit-abhängigen Transkriptionsfaktor. Das Fehlen anderer Elektronenakzeptoren ist nicht hinreichend für die Produktion der Mcc-Proteine, was eine Derepression bei Wegfall anderer Elektronenakzeptoren als Erklärung unwahrscheinlich macht. In der Transkriptionsanalyse des Stammes *W. succinogenes nosZ⁺*, dessen *mccR* dem des Wildstammes entspricht, waren die den *mcc*-Genen zugeordneten Transkripte in Zellen, die durch Fumarat-, Nitrat- oder N₂O-Atmung vermehrt wurden, nahezu nicht nachweisbar (Hein S. und Simon J., unveröffentlicht). Interessanterweise wurde eine RNA identifiziert, dessen Gen innerhalb und nahe des 5'-Endes des Leserahmens von *mccA* liegt und welche einen Inhibitor der *mcc*-Expression durch RNAi darstellen könnte (Hein S. und Simon J., unveröffentlicht). MccA wurde bei gleichzeitigem Vorhandensein von Nitrat nicht produziert (Abbildung 48 im Anhang). Es wird daher davon ausgegangen, dass *W. succinogenes* bei Wahl zwischen Sulfit und einem Elektronenakzeptor mit positiverem Potential des korrespondierenden Redoxpaares letzteres vorzieht. Bei Vorhandensein von mehreren Elektronenakzeptoren produzieren Bakterien wie *Escherichia coli* die Proteine für die Atmung des Elektronenakzeptors mit dem positivsten Potential des Redoxpaares und unterdrücken die Produktion der alternativen Atmungs-Systeme bzw. -Komplexe [49]. Nach Verbrauch des zuerst geatmeten Elektronenakzeptors werden die Proteine für die Atmung des Substrates mit dem nächsthöheren Potential des Redoxpaares produziert. Dies sorgt für die effiziente Atmung von

Elektronenakzeptoren ohne gleichzeitige Produktion mehrerer Atmungs-Systeme bzw. -Komplexe. Bei *W. succinogenes* wird eine solche Hierarchie zwar nicht für jeden Elektronenakzeptor befolgt, beispielsweise wird Polysulfid den Alternativen Fumarat und Nitrat vorgezogen [50]. Sulfit hingegen scheint den günstigeren Elektronenakzeptoren Fumarat, Nitrat und Nitrit nachgestellt zu sein.

Die zusätzliche Fumarat-Atmung erlaubte es Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ cat*, auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium, verglichen mit solchen auf Formiat-Sulfit-Medium, zu deutlich höherer optischer Dichte zu wachsen. Interessanterweise verbrauchten Zellen von *W. succinogenes mccR⁺ cat* auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium nach 24 h und Reduktion von 10 mM Sulfit etwa 60 mM Fumarat anstelle der erwarteten 75 mM. Die Ursache für diese Diskrepanz ist im Rahmen dieser Arbeit nicht ersichtlich. Möglicherweise wurde das Wachstum der Zellen nach Produktion von Sulfid durch Intoxikation eingeschränkt. Sofern das Sulfid nicht als Schwefelwasserstoff entweicht, kann es mit Thiol-Gruppen verschiedener Biomoleküle und als Ligand von Häm-Gruppen im aktiven Zentrum von Cytochromen reagieren und den bakteriellen Metabolismus einschränken [51]. Für *Desulfovibrio vulgaris* wurde die Inhibierung des Wachstums durch produziertes Sulfid demonstriert [52]. Darüber hinaus ist es möglich, dass Zellen von *W. succinogenes mccR⁺ cat* bei gleichzeitigem Vorhandensein von Fumarat und Sulfit nicht das komplette Fumarat aufbrauchen konnten, wodurch der Fumaratreduktase-abhängige Formiatverbrauch geringer war als erwartet. Sofern dies stimmt, wäre die durch Sulfitverbrauch mögliche Erhöhung der optischen Dichte auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium größer als beobachtet.

Da für jedes mol reduziertes Sulfit bzw. produziertes Sulfid drei mol Formiat oxidiert werden sollten, wurde während des Elektronentransportes ein Verhältnis der Formiat-Oxidations- zu Sulfit-Reduktions-Rate von 3:1 erwartet. Bei den Zellsuspensionen, welche MccA produziert hatten, lagen die beobachteten Raten zwischen 2,9:1 und 3,5:1 von Formiat zu Sulfit, was in Übereinstimmung mit dieser Erwartung war. Interessanterweise lagen die Umsatzraten der zuvor auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium vermehrten Wildstamm-Zellsuspensionen bei 71 bis 82 % der Raten der der Suspensionen von *W. succinogenes mccR⁺ cat* auf ebendiesem Medium. Auch die Raten von *W. succinogenes mccR⁺ cat* auf Formiat-Sulfit-Medium waren vergleichbar mit denen von Zellsuspensionen des Wildstammes und liegen entsprechend deutlich niedriger als die von Zellsuspensionen dieser Mutante von Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium (Tabelle 22). Während die niedrigen Raten der Suspensionen von *W. succinogenes mccR⁺ cat* ungewöhnlich scheinen, können sie beim Wildstamm durch die lange Inkubationszeit im Medium erklärt werden. Während der langen Inkubation in der stationären Phase kommt es bei vielen Bakterien zur Persistenz, wobei die Protein-Produktion nahezu eingestellt wird. In der Zelle vorhandene

Proteine stehen stets im Gleichgewicht zwischen Produktion und Abbau, welche die Halbwertszeit des Proteins bestimmen. In persistierenden Bakterien werden sowohl die Produktions-, als auch die Proteolyse-Rate verringert, was die Halbwertszeit und somit den Anteil von funktionslosem Protein erhöht. Hierdurch kann der Anteil an aktivem Mcc-System verringert sein, was die niedrigeren Umsatzraten während des Elektronentransport-Assays erklären könnte.

6.2. Rolle der Gene des *mcc*-Genclusters

6.2.1. Deletion der *mcc*-Gene

Nach Erstellung *W. succinogenes mccR⁺ cat*, in welcher Sulfitatmung innerhalb von wenigen Stunden nach Exposition mit Sulfit möglich war, wurde mithilfe dieser die Rolle der *mcc*-Gene untersucht. Die Gene *mccA*, *-B*, *-C*, *-D* oder *-L* wurden einzeln, *mccE* und *-F* simultan deletiert (der Übersichtlichkeit halber sind die Genkarten in Abbildung 19 dargestellt). Um polare Effekte durch den Transkriptionsterminator der Antibiotika-Resistenzgen-Kassette zu vermeiden, wurde mit Ausnahme von *W. succinogenes mccR⁺ ΔmccL::kan* stromabwärts der jeweiligen Resistenzgen-Kassette ein weiteres *mcc*-Promotorelement eingeführt. Zur Kontrolle, ob das *mcc*-Promotorelement notwendig und ausreichend für die Mcc-Produktion war, wurden zwei weitere Mutanten konstruiert: Bei der Mutante *W. succinogenes mccR⁺ komp mcc* lag zwischen *mccA* und *-B* eine Kanamycin-Resistenzgen-Kassette, gefolgt von einem *mcc*-Promotorelement, wobei keine Gene deletiert wurden. Darüber hinaus wurde eine Mutante mit *W. succinogenes mccR⁺ ΔP_{mcc} mcc* konstruiert, bei welcher verglichen mit *W. succinogenes mccR⁺ komp mcc* das Promotor-Element zwischen der Resistenzgen-Kassette und *mccB* fehlte.

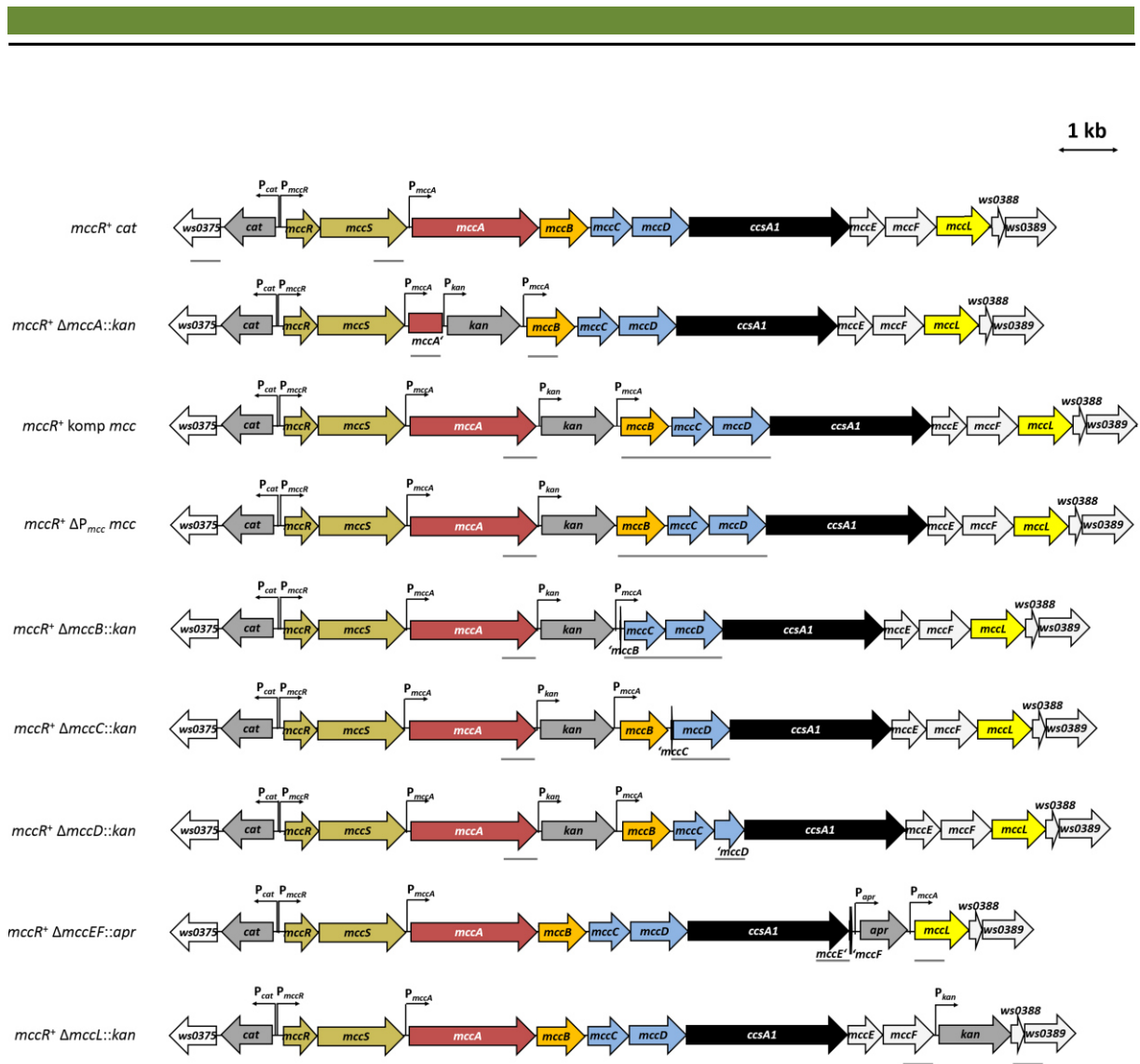


Abbildung 19. *mcc*-Gencluster der in Kap. 6.2 untersuchten *mcc*-Mutanten. Graue Linien unter den Leserahmen zeigen den Bereich der Rekombination mit dem passenden Plasmid, durch welches die Mutante konstruiert worden war (für die Zuordnung der Mutanten zu den entsprechenden Plasmiden siehe Kap. 3.5.8). Der Rekombinationsbereich unter den Leserahmen von *W. succinogenes mcrR⁺ cat* veranschaulicht die Rekombination ausgehend von *W. succinogenes ΔmccRS::kan*.

Kulturen von *W. succinogenes mcrR⁺ komp mcc* wuchsen auf eine mit Kulturen von *W. succinogenes mcrR⁺ cat* vergleichbare optische Dichte (Abbildung 20A–D, Tabelle 23). Wie *W. succinogenes mcrR⁺ cat* verbrauchten sie innerhalb von 10 h nach Inokulierung das vorgelegte Sulfit, was mit dem Verbrauch von etwa 75 mM Formiat und der Produktion von etwa 6 mM Sulfid korrelierte (Abbildung 21A). Kulturen der Mutante *W. succinogenes mcrR⁺ ΔP_{mcc} mcc* wuchsen nicht höher als Kulturen von *W. succinogenes mcrR⁺ ΔmccA::kan*, reduzierten während der 24-stündigen Inkubation kein Sulfit und verbrauchten etwa 40 mM Formiat (Abbildung 21B, C). Kulturen der Mutanten ohne *mccb*, *-C* oder *-D* wuchsen in Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium ebenfalls nicht höher als die *mccA*-Mutante und waren während des Wachstums nicht in der Lage, Sulfit umzusetzen (Abbildung 21D–F). Hiermit einhergehend zeigten Zellsuspensionen von Mutanten ohne *mccb*, *-C* oder *-D* keine Formiat-abhängige

Sulfitreduktions-Aktivität (Tabelle 23). Zellen der Mutante *W. succinogenes* *mccR*⁺ Δ *mccB*::*kan* produzierten während des Wachstums auf Sulfit-haltigem Medium kein MccA, während bei Zellen der Mutanten ohne *mccC* oder *-D* stabiles MccA mittels Häm-Färbung nachgewiesen wurde (Abbildung 22). Kulturen von *W. succinogenes* *mccR*⁺ Δ *mccEF*::*apr* wuchsen vergleichbar mit solchen von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *cat* oder *W. succinogenes* *mccR*⁺ komp *mcc* und verbrauchten während der ersten 10 h nach Inokulierung das vorgelegte Sulfit (Abbildung 21G).

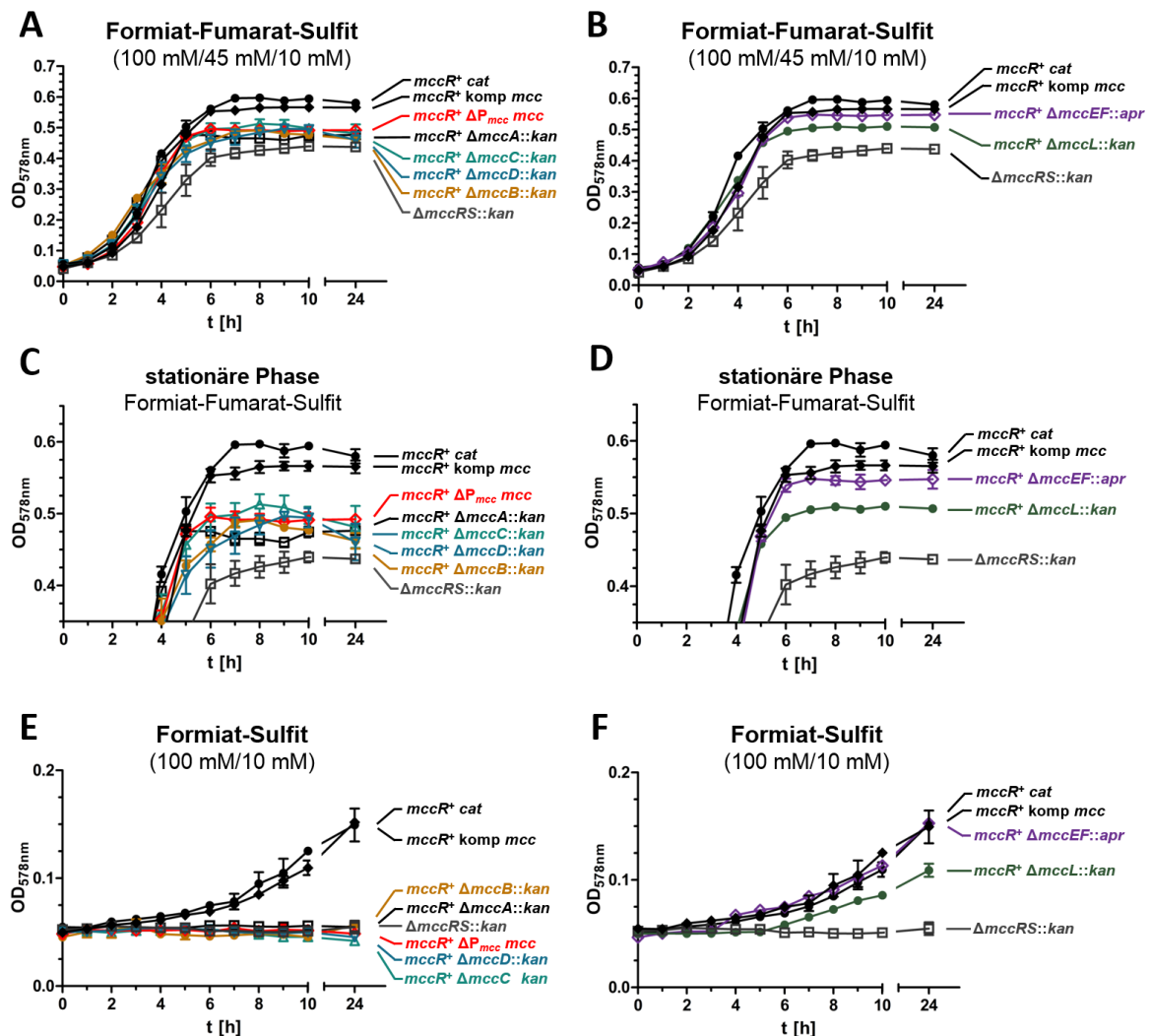


Abbildung 20. Charakterisierung des Wachstums durch Sulfitatmung der *mcc*-Mutanten über 24 h. Jede Messung wurde mit 3 biologischen Replikaten durchgeführt. A+B: Wachstum von Kulturen auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium. C+D: Ausschnitt der stationären Phase der Wachstumskurven von A bzw. B. E+F: Wachstum der in Formiat-Sulfit-Medium vermehrten Kulturen von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *cat*, *W. succinogenes* komp *mcc* und der *mcc*-Mutanten.

Auch die Umsatzraten der Metabolite während des Elektronentransportes wichen nur um etwa 1 % von denen von *W. succinogenes mccR⁺ cat* ab (vergleiche in Tabelle 23). Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ΔmccL::kan* wuchsen auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium nicht so hoch wie Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ cat*, aber höher als Kulturen der Mutanten, welche nicht zur Sulfitatmung fähig waren (Abbildung 20). Ihre optische Dichte erhöhte sich in der stationären Phase um 0,035 gegenüber Kulturen ohne *mccA*. Diese Kulturen reduzierten Sulfit nicht so effizient wie *W. succinogenes mccR⁺ cat* (Abbildung 21H) und entsprechend lagen die Metabolit-Umsatzraten zwischen 55 und 70 % der von Kulturen von *W. succinogenes cat*, welche unter gleichen Bedingungen gewachsen waren (Tabelle 23).

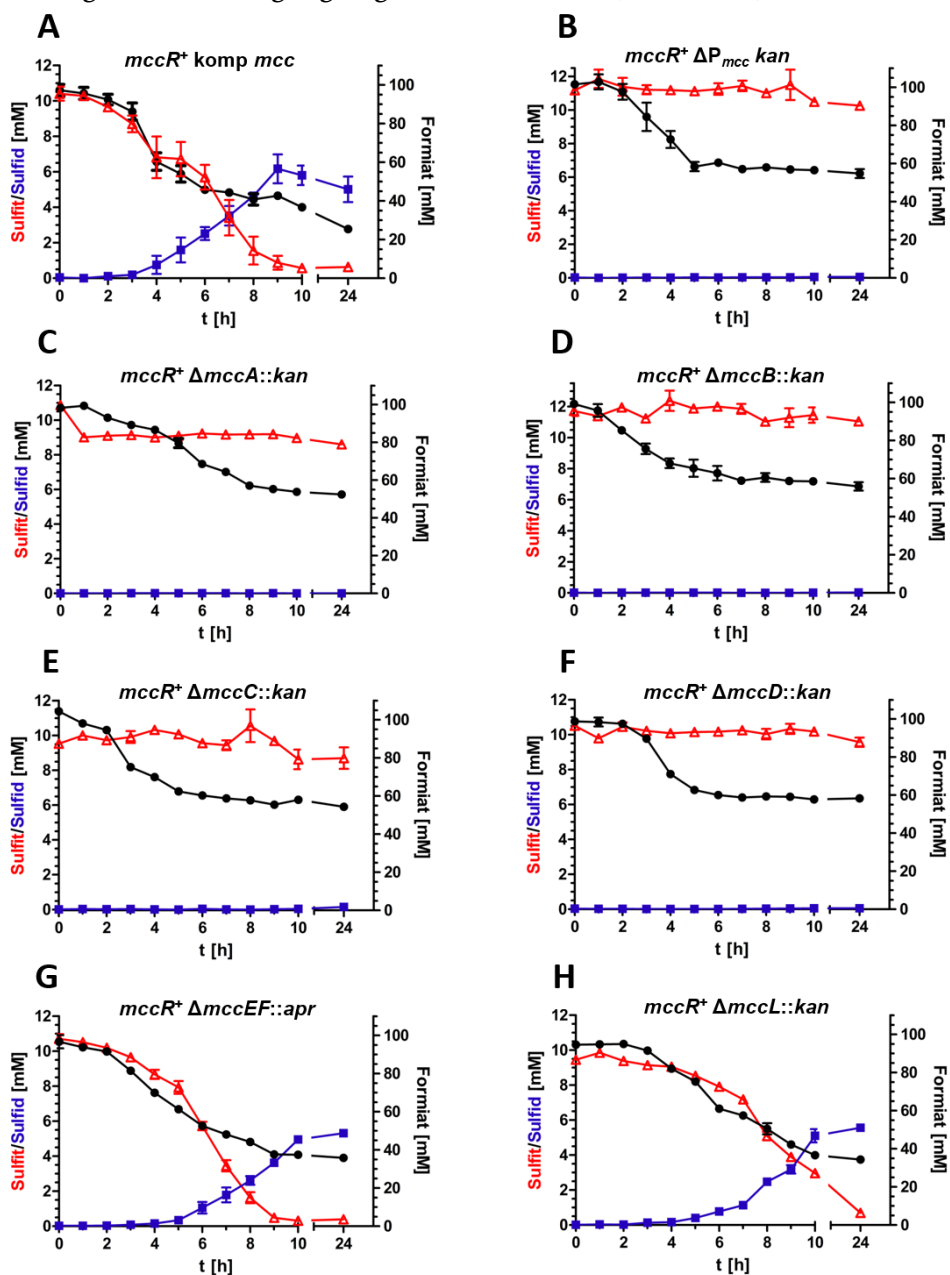


Abbildung 21. Metabolit-Umsatz von Kulturen der *mcc*-Mutanten. Die Konzentrationen von Formiat, Sulfit und Sulfid, welche während des Wachstums auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium gemessen wurden, sind dargestellt (Abbildung 20A–D). Jeder Wert wurde mithilfe von 3 biologischen Replikaten bestimmt.

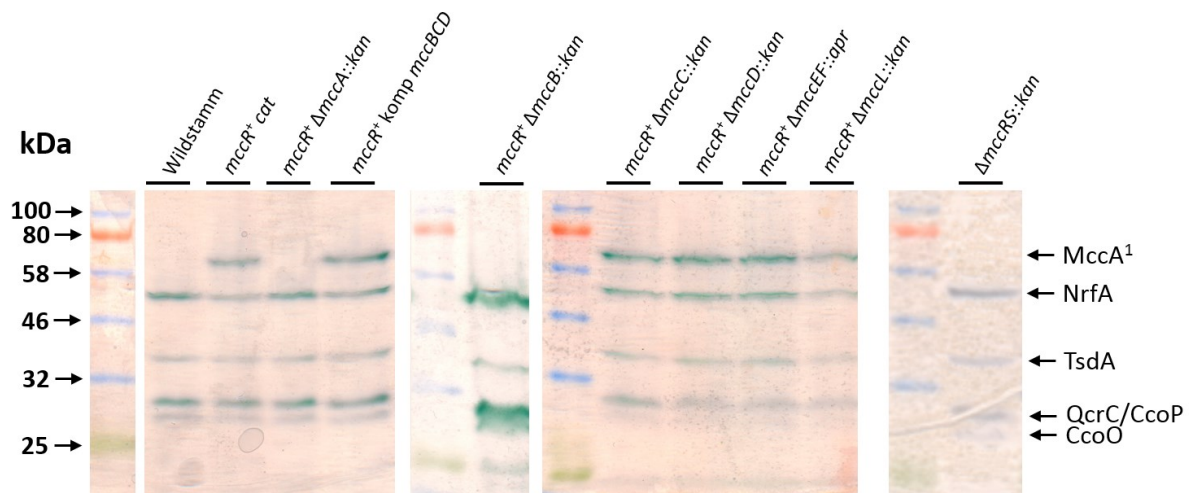
Tabelle 23. Charakterisierung des Wachstums und der Sulfitatmung von *W. succinogenes mccR⁺ cat* sowie der *mcc*-Mutanten. Erreichte OD₅₇₈, Verdopplungszeiten sowie Sulfit-, Formiat-Verbrauch sowie Sulfid-Produktion von Zellsuspensionen der frühen stationären Phase sind aufgelistet. Jeder Mittelwert und dessen Standardabweichung wurde mithilfe von 3 biologischen Replikaten bestimmt. ∞ bedeutet, dass Wachstum ausblieb.

Stamm/Mutante	OD ₅₇₈ in der stationären Phase ¹	Verdopplungszeit [min] ¹	Verbrauchsrate	Verbrauchsrate	Produktionsrate
			Formiat	Sulfit	Sulfid
[nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹]					
Formiat-Fumarat-Sulfit (100 mM/45 mM/10 mM)					
<i>mccR⁺ cat</i>	0,597 ± 0,012	63 ± 9	239 ± 20	68 ± 7	63 ± 4
<i>mccR⁺ komp <i>mcc</i></i>	0,557 ± 0,011	72 ± 11	225 ± 19	61 ± 6	57 ± 4
<i>mccR⁺ Δ<i>P_{mcc}</i> <i>mcc</i></i>	0,486 ± 0,016	70 ± 7	< 0,1	< 0,1	< 0,1
<i>mccR⁺ Δ<i>mccA::kan</i></i>	0,476 ± 0,016	73 ± 18	< 0,1	< 0,1	< 0,1
<i>mccR⁺ Δ<i>mccB::kan</i></i>	0,491 ± 0,010	65 ± 6	< 0,1	< 0,1	< 0,1
<i>mccR⁺ Δ<i>mccC::kan</i></i>	0,484 ± 0,007	69 ± 4	< 0,1	< 0,1	< 0,1
<i>mccR⁺ Δ<i>mccD::kan</i></i>	0,487 ± 0,004	67 ± 2	< 0,1	< 0,1	< 0,1
<i>mccR⁺ Δ<i>mccEF::apr</i></i>	0,548 ± 0,011	72 ± 2	210 ± 9	63 ± 3	51 ± 3
<i>mccR⁺ Δ<i>mccL::kan</i></i>	0,511 ± 0,021	77 ± 13	155 ± 17	45 ± 6	35 ± 4
<i>Δ<i>mccRS::kan</i></i>	0,450 ± 0,010	75 ± 12	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Formiat-Sulfit (100 mM/10 mM)					
<i>mccR⁺ cat</i>	0,149 ± 0,013	216 ± 59	187 ± 14	63 ± 5	51 ± 4
<i>mccR⁺ komp <i>mcc</i></i>	0,152 ± 0,009	297 ± 33	213 ± 11	67 ± 5	57 ± 4
<i>mccR⁺ Δ<i>P_{mcc}</i> <i>mcc</i></i>	0,052 ± 0,003	∞	n.b. ²	n.b. ²	n.b. ²
<i>mccR⁺ Δ<i>mccA::kan</i></i>	0,056 ± 0,004	∞	n.b. ²	n.b. ²	n.b. ²
<i>mccR⁺ Δ<i>mccB::kan</i></i>	0,050 ± 0,002	∞	n.b. ²	n.b. ²	n.b. ²
<i>mccR⁺ Δ<i>mccC::kan</i></i>	0,053 ± 0,004	∞	n.b. ²	n.b. ²	n.b. ²
<i>mccR⁺ Δ<i>mccD::kan</i></i>	0,054 ± 0,001	∞	n.b. ²	n.b. ²	n.b. ²
<i>mccR⁺ Δ<i>mccEF::apr</i></i>	0,153 ± 0,006	274 ± 26	214 ± 9	68 ± 3	56 ± 1
<i>mccR⁺ Δ<i>mccL::kan</i></i>	0,109 ± 0,011	343 ± 24	127 ± 9	43 ± 4	36 ± 4
<i>Δ<i>mccRS::kan</i></i>	0,054 ± 0,002	∞	n.b. ²	n.b. ²	n.b. ²

¹Die maximale OD₅₇₈ und die Verdopplungszeit wurden anhand von Formel (6) in Kap. 5.10.1 berechnet.

²nicht bestimmbar, da kein Wachstum

Auf Medium mit Sulfit als alleinigem Elektronenakzeptor wuchsen Kulturen der Mutanten *W. succinogenes* *mccR*⁺ Δ *mccB::kan*, *W. succinogenes* *mccR*⁺ Δ *mccC::kan* und *W. succinogenes* *mccR*⁺ Δ *mccD::kan* nicht (Abbildung 20E). Wie beim Wachstum auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium zeigten Kulturen der Mutanten ohne *mccE* oder *-F* auch auf Formiat-Sulfit-Medium ein mit Kulturen von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *cat* oder *W. succinogenes* *mccR*⁺ komp *mcc* vergleichbares Wachstum (Abbildung 20F). Analog zum Verhalten auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium waren Kulturen der Mutante ohne *mccL* auf Formiat-Sulfit-Medium zum Wachstum in der Lage, erreichten aber nicht die optische Dichte von Kulturen von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *cat*. Die Umsatzraten-Raten von Suspensionen der Mutanten, welche auf Formiat-Sulfit-Medium vermehrt wurden, unterschieden sich nicht signifikant von denen von Kulturen, welche auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium wuchsen (Tabelle 23).



¹sofern MccA von dem Stamm oder der Mutante produziert wurde

Abbildung 22. Nachweis von MccA in Zellen der *mcc*-Mutanten. Zellen wurden auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium vermehrt und nach 24 h geerntet. 100 μ g Protein des Zell-Lysats wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend wurden die Cytochrome *c* mittels Häm-Färbung detektiert. Als Proteinleiter diente die Color Prestained Protein Ladder P7712.

6.2.2. Diskussion

Mithilfe der von *W. succinogenes mccR⁺ cat* abgeleiteten Mutanten wurde erstmals die Notwendigkeit einzelner *mcc*-Gene in einer Mutante, welche rasch auf Sulfit reagiert, erforscht. Neben MccA waren die anderen Genprodukte des *mcc*-Genclusters vermutlich entweder für die Reifung von MccA zuständig (MccB, CcsA1, MccL) oder für den Elektronentransport (MccC, MccD). Da die Deletion von *mccB* oder *-L* hypothetisch die Reifung von MccA beeinflusst, wurde erwartet, dass deren Deletion die Eigenschaften des Enzyms verändern, was bei der Detektion von MccA durch Häm-Färbung erkennbar sein könnte. Bei der Deletion von *mccC* oder *-D* hingegen sollte MccA unverändert sein, der Elektronentransport aber dennoch negativ beeinflusst werden. Die im Vergleich zu *W. succinogenes mccR⁺ cat* veränderte genetische Architektur von *W. succinogenes mccR⁺ komp mcc* sowie der hiervon abgeleiteten Mutanten könnte hypothetisch die Expression und somit die Sulfitatmung beeinflussen. Da Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ komp mcc* vergleichbar mit *W. succinogenes mccR⁺ cat* Sulfit atmeten, schien die Produktion der Mcc-Proteine bei Einschub der Resistenzgenkassette und des *mcc*-Promotorelementes nicht beeinflusst worden zu sein. Die Funktionalität des Transkriptionsterminators wurde durch Erstellung der Mutante *W. succinogenes mccR⁺ ΔP_{mcc} mcc* bestätigt, welche korrelierend mit dem Fehlen des zweiten Promotorelementes nicht zur Sulfitatmung in der Lage ist.

Hypothetisch ist MccB für die Reifung von MccA durch Isomerisierung der Peptidbindung zwischen G508 und F509 notwendig. Diese beiden Reste liegen in einer Schleife sterisch nahe des Häm *c* 8 im CH₁₅CH-Motiv und spielen möglicherweise eine Rolle in der Stabilisierung der Domäne und der Ausrichtung des besagten Kofaktors (siehe **Kap. 4.2.2**). Diese Häm *c*-Gruppe liegt nicht wie die übrigen in der für Multihäm-Cytochrome *c* typischen parallel oder aufrechten Anordnung zweier benachbarter Häm *c*-Gruppen [53–55], sondern befindet sich verdreht nahe der Proteinoberfläche [11]. Die beobachtete Konformation dieser Häm *c*-Gruppe ist wahrscheinlich sowohl für die Stabilität als auch für den Kontakt zwischen MccA und MccC notwendig. Zellen von *W. succinogenes mccR⁺ ΔmccB::kan* waren wie zuvor untersuchte vergleichbare Zellen mit dem *mcc*-Gencluster unter der Kontrolle des Fumaratreduktase-Promotors nicht in der Lage, MccA zu produzieren [12]. Dies bestätigte die Notwendigkeit von MccB für die Stabilität von MccA.

Für die konstante Belieferung mit Elektronen für die Sulfit-Reduktion ist MccA mit dem Menachinonpool verbunden. Im für die Mcc-katalysierte Sulfitreduktion aufgestellte Modell dient ein Komplex aus MccC und *-D* der Oxidation von entweder MK oder 8-MMK (Abbildung 5). Bei MccD handelt es sich um ein 8 Transmembranhelizes enthaltene Protein mit periplasmatischem N- und C-Terminus, welches wie PsrC zur NrfD-Superfamilie gehört. Die

konservierte Bindetasche befindet sich wie bei PsrC nahe des Periplasmas [48]. Es ist bisher allerdings unklar, ob es sich bei diesem Substrat um MK und/oder 8-MMK handelt bzw. wie selektiv MccD ist. MccC gehört zur PsrB-Superfamilie und ist ein vier [4Fe4S]-Zentren enthaltendes Protein, welches vermutlich die Elektronen von MccD aufnimmt und an MccA weitergibt. Bei zuvor durchgeführten Reinigungen von MccA wurden allerdings keine fest mit der Sulfitreduktase assoziierten Proteine eluiert. Nach Trennung der löslichen und der Membranfraktion von aufgeschlossenen Zellen von *W. succinogenes mcrR⁺ cat* nach Sulfit-Exposition ließ sich MccA vornehmlich in der löslichen Fraktion nachweisen, während NrfH (und ein Großteil von NrfA), PetC und CcoP in der Membranfraktion vorlagen (Abbildung 49 im Anhang). Dies spricht gegen das Modell eines fest assoziierten Mcc-Proteinkomplexes, wie er bei manchen anderen respiratorischen Enzymen wie NrfHA besteht [55–57]. Vor der Charakterisierung der *mccC* und *-D*-Deletionsmutanten konnte hypothetisch angenommen werden, dass MccA nicht nur von MccD, sondern auch von alternativen Menachinol-Dehydrogenase-Komplexen Elektronen erhalten könnte. Die Notwendigkeit von sowohl *mccC* als auch *-D* spricht allerdings für einen linearen Elektronentransport zwischen *W. succinogenes*-MccA und dem Menachinonpool während der Sulfitreduktion.

Die Entdeckung des von den Aminosäure-Resten C399 und C495 gebundenen Cu(I) im aktiven Zentrum von MccA bot eine Erklärung für den teilweisen Verlust der sulfitspezifischen Aktivität nach Exposition mit Sauerstoff [12]. Vermutlich erhält das im *mcc*-Gencluster kodierte MccL das Cu(I) von anderen periplasmatischen Kupferchaperonen oder von einer membranständigen Cu(I)-exportierenden ATPase und überträgt es entweder allein oder im Zusammenspiel mit anderen Proteinen auf die Cystein-Reste C399 und C495 von MccA (mehr zu Cu-transportierenden Proteinen in **Kap. 6.5.4**). Interessanterweise war *W. succinogenes mcrR⁺ ΔmccL::kan* in der Lage, Sulfit zu atmen, wenngleich mit nur 41 bis 59 % der Rate von *W. succinogenes mcrR⁺ cat*. Für das Vorhandensein von Cu(I) im aktiven Zentrum von MccA muss allerdings nicht notwendigerweise ein weiteres Kupferchaperon die Beladung katalysieren. Es ist denkbar, dass Cu²⁺ einen Teil des ansonsten von MccL gelieferten Cu(I) im aktiven Zentrums von MccA nach Auto-Reduktion ersetzt. Obwohl bisher kein plausibler Reaktionsmechanismus formuliert werden konnte, wurde die Reduktion von Cu²⁺ bei Bindung an schwefelhaltige Liganden sowohl bei niedermolekularen Substanzen als auch sowohl bei Kupferchaperonen mit Cystein-haltigen Kupferbindemotiven beobachtet [58–60]. Durch Diffusion von Cu²⁺ in das aktive Zentrum von MccA mit anschließender Reduktion könnte das Enzym immer noch zur Sulfitreduktion fähig sein, selbst wenn kein Kupferchaperon die Funktion von MccL übernehmen kann.

MccE gehört zur CopD-Proteinfamilie und liegt hypothetisch in der Membran lokalisiert vor. MccF wird aufgrund seiner Sec-Signalsequenz (Aminosäure-Reste 1 bis 18) vermutlich in das Periplasma exportiert. Mit seinen 7 CX₇C- und 5 Sel1-Motiven gehört es zu den Sel1-Repeat-Proteinen, welchen unter anderem eine Rolle in der Rekrutierung von Proteinen zugeschrieben wird [61]. Es wäre denkbar, dass MccE und -F einen Komplex für den Export von Cu(I) und die anschließende Beladung von MccL bilden. MccE könnte Cu(I) von einer Cu-transportierenden ATPase oder einem anderen Cu-transportierenden Protein empfangen, anschließend könnte MccF das MccE und ein Cu(I)-empfangendes Protein wie MccL rekrutieren und so die Interaktion dieser katalysieren (siehe **Kap. 6.5.4**). Die gemeinsame Deletion von *mccE* und *-F* zeigte keinen erkennbaren Effekt auf die Sulfitreduktion von *W. succinogenes*. Zum einen könnte dies daran liegen, dass MccE und -F keine Rolle für die Sulfit-Atmung besitzen, zum anderen daran, dass bei deren Abwesenheit deren Aufgabe von anderen Proteinen übernommen wird.

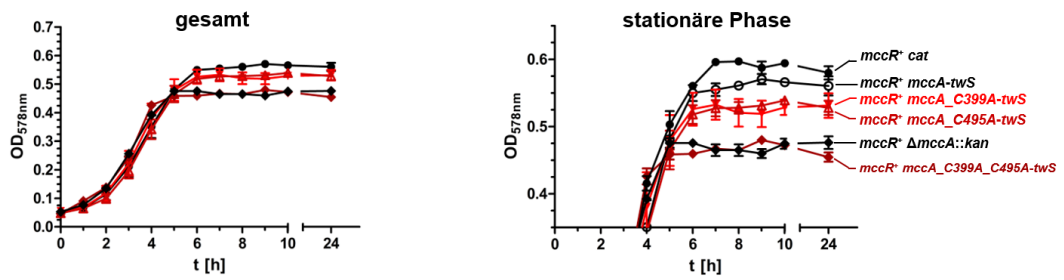
6.3. Untersuchung der Cu(I)-abhängigen MccA-Aktivität

6.3.1. Charakterisierung von MccA und dessen Cystein-Austauschvarianten

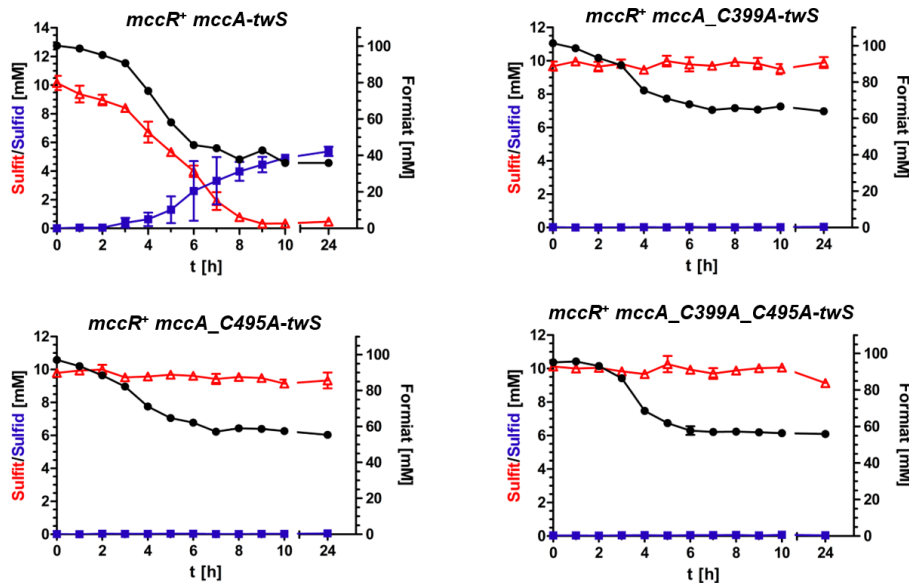
Da das Cu(I) im aktiven Zentrum von MccA von den Aminosäure-Resten C399 und C495 gebunden wird, erscheint es plausibel, dass diese Cysteine für die Cu(I)-Bindung auch notwendig und somit essentiell für die Sulfitreduktase-Aktivität sind. Zur Überprüfung der Hypothese, ob die Cystein-Reste notwendig für die Sulfitreduktion sind, sollten MccA sowie Proteinvarianten, bei welchen eines oder beider dieser Cysteine ausgetauscht waren, produziert, gereinigt und auf ihre optischen sowie ihre Aktivität hin untersucht werden. Hierzu wurden *W. succinogenes* *mccR*⁺ *cat*-Mutanten erstellt, aus welchen das produzierte MccA mit Hilfe eines C-Terminal fusionierten Twin-Strep-Tag gereinigt werden konnte [62] (im Folgenden als MccA-twS abgekürzt). Die korrespondierende Mutante wurde *W. succinogenes* *mccR*⁺ *mccA-twS* genannt (Abbildung 23). Bei den hiervon abgeleiteten Mutanten *W. succinogenes* *mccR*⁺ *mccA_C399A-twS* sowie *W. succinogenes* *mccR*⁺ *mccA_C495A-twS* wurde eines der beiden Cysteine durch Alanin ausgetauscht, bei *W. succinogenes* *mccR*⁺ *mccA_C399A_C495A-twS* beide Cysteine. Neben der Reinigung von MccA wurde auch das Wachstum sowie die Sulfitatmung dieser Mutanten abhängig vom Vorhandensein von Sulfit im Medium charakterisiert. Um einen eventuellen Einfluss des Twin-Strep-Tags während der Sulfitatmung zu beachten, wurde das Wachstum sowie die Umsatzraten von Formiat, Fumarat und Sulfit von Kulturen der Kontrolle *W. succinogenes* *mccR*⁺ *mccA-twS* mit denen von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *cat* verglichen. Kulturen von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *mccA-twS* wuchsen auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium vergleichbar mit Kulturen von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *cat* (Abbildung 23A, B) und reduzierten das gesamte vorgelegte Sulfit innerhalb von 10 h nach Inokulierung (Abbildung 23C). Zellsuspensionen von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *mccA-twS* setzten Sulfit und Formiat etwas schneller, aber dennoch in mit *W. succinogenes* *mccR*⁺ *cat* vergleichbarer Rate um (Tabelle 24). Die offenbar etwas erhöhte Umsatzrate dieser Metabolite spiegelte sich in der verglichen mit Suspensionen von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *cat* ebenfalls etwas erhöhten Produktionsrate von Sulfid wider.

A

Wachstum



Metabolite



B

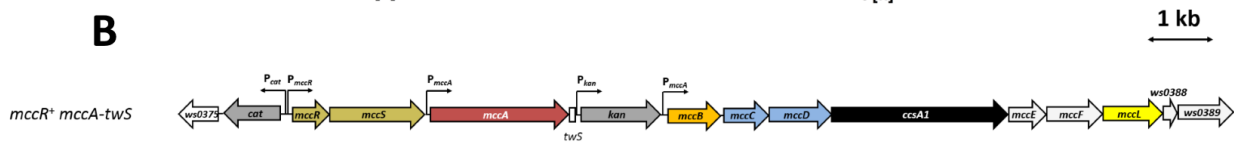


Abbildung 23. Charakterisierung der Fähigkeit zur Sulfitatmung der Kulturen von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *mccA*-twS, dessen Cysteinaustausch-Varianten und von Kontroll-Kulturen. Alle Kulturen wurden auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium vermehrt. Oben sind die gesamten Wachstumskurven (links) sowie deren stationäre Phase (rechts) dargestellt. Unten sind die mit dem Wachstum korrelierende Konzentrationen von Sulfit, Sulfid und Formiat abgebildet. Pro Mutante wurden 3 biologische Replikate eingesetzt. **B:** Genkarte von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *mccA*-twS. Graue Linien unter den Leserahmen zeigen den Bereich der Rekombination mit dem passenden Plasmid, durch welches die Mutante konstruiert worden war (siehe Tabelle 4 und Abbildung 47 im Anhang).

Tabelle 24. Charakterisierung des Wachstums sowie der Sulfitatmung der *W. succinogenes mccR⁺ mcca*-Mutanten. Kulturen für die Bestimmung der OD₅₇₈ und der Verdopplungszeit wurden auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium vermehrt. Die Umsatzraten der Metabolite wurden mithilfe von Zellsuspensionen der jeweiligen Mutante gemessen (Kap. 5.10.2). Jeder Mittelwert und dessen Standardabweichung wurde mithilfe von 3 biologischen Replikaten bestimmt.

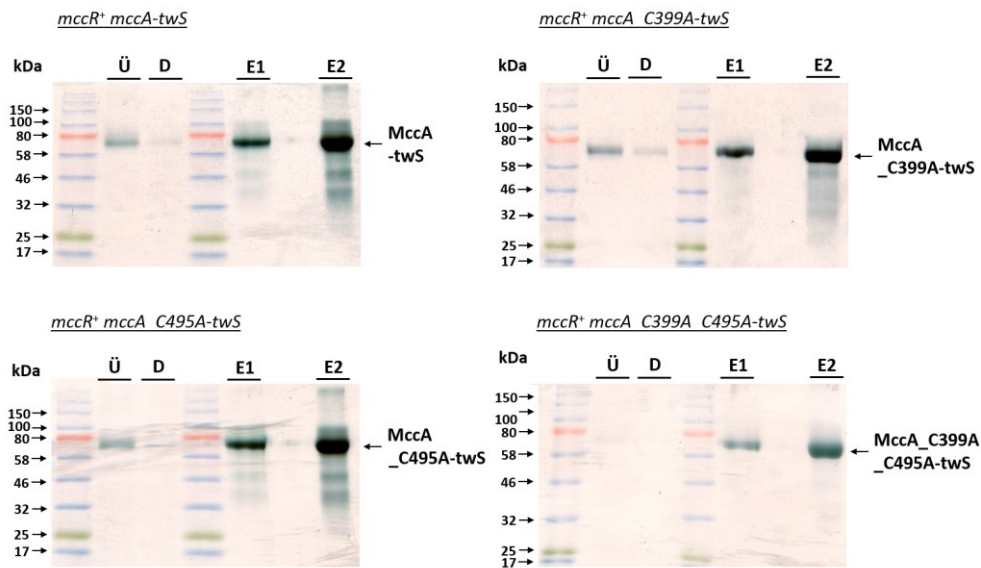
Stamm/Mutante	OD ₅₇₈ in der stationären Phase ¹	Verdopplungszeit [min] ¹	Verbrauchsrate	Verbrauchsrate	Produktionsrate
			Formiat	Sulfit	Sulfid
			[nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹]		
<i>mccR⁺ cat</i>	0,597 ± 0,012	63 ± 9	239 ± 20	68 ± 7	63 ± 4
<i>mccR⁺ mcca-twS</i>	0,571 ± 0,013	67 ± 3	266 ± 24	74 ± 6	63 ± 4
<i>mccR⁺ mcca_C399A-twS</i>	0,539 ± 0,004	63 ± 3	< 0,1	< 0,1	< 0,1
<i>mccR⁺ mcca_C495A-twS</i>	0,531 ± 0,032	64 ± 5	< 0,1	< 0,1	< 0,1
<i>mccR⁺ mcca_C399A_C495A-twS</i>	0,466 ± 0,032	72 ± 1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
<i>mccR⁺ Δmcca::kan</i>	0,476 ± 0,016	73 ± 18	< 0,1	< 0,1	< 0,1

¹Die OD₅₇₈ nach 24 h Inkubation und die Verdopplungszeit wurden anhand der Werte, welche optische in den Wachstumskurven dargestellt sind, errechnet (siehe Formel (6) in Kap. 5.10.1).

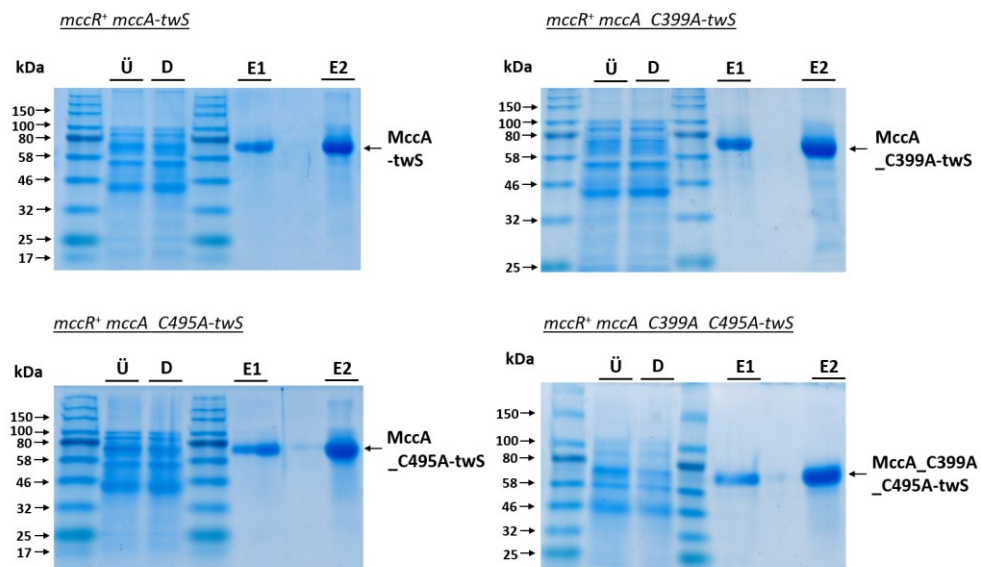
Wurden entweder C399 oder C495 in MccA durch Alanin ausgetauscht, so wuchsen die Kulturen der jeweiligen Mutante weniger hoch als die MccA-twS produzierenden, besaßen bei Erreichen der stationären Phase jedoch eine höhere Dichte als solche von *W. succinogenes mccR⁺ Δmcca::kan*. Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ mcca_C399A_C495A-twS* hingegen wuchsen nicht höher als Kulturen der *mcca*-Deletionsmutante. Nach 24 h Inkubation lag die Formiat-Konzentration in Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ mcca-twS* bei etwa 36 mM, entsprechend wurde mit 64 mM Formiat 19 mM mehr verbraucht als für die alleinige Fumarat-Atmung. Die nach 24-stündiger Inkubation verbliebene Formiat-Konzentration von Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ mcca_C495A-twS* (55 mM) und *W. succinogenes mccR⁺ mcca_C399A_C495A-twS* (56 mM) war mit der von *W. succinogenes mccR⁺ mcca::kan* (52 mM) vergleichbar, es wurden von diesen Mutanten je 45 mM bzw. 46 mM Formiat verbraucht. Bei Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ mcca_C399A-twS* verblieben etwa 64 mM, somit wurden nur 36 mM Formiat verbraucht. Zellen produzierten je nach Mutante MccA-twS oder die jeweilige Cystein-Austausch-Variante in vergleichbarer Menge (nicht gezeigt). Dennoch waren Zellen, welche die Cystein-Austauschvarianten von MccA produzierten, weder während des Wachstums (Abbildung 23D–F), noch während der Messung des Elektronentransportes von Zellsuspensionen (Tabelle 24) zur Sulfitreduktion in der Lage.

A

Häm-Färbung



Coomassie-Färbung



B

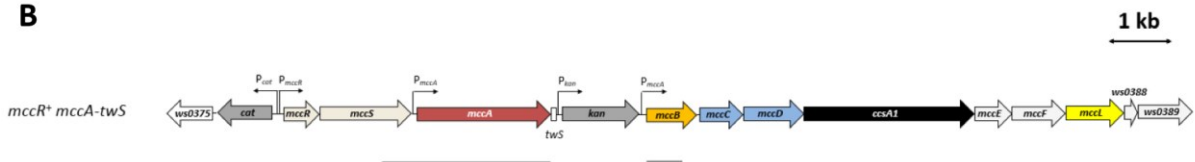


Abbildung 24. Produktion von MccA-twS **A**: Nachweis von MccA-twS sowie der Cystein-Austausch-Varianten nach Reinigung. Der Überstand (Ü), Durchfluss der Säule (D) sowie das Eluat (E) wurden mittels SDS-PAGE getrennt. Anschließend wurde mit den aufgetrennten Fraktionen zum einen eine Coomassie-Färbung, zum anderen eine Häm-Färbung durchgeführt. Aufgetragene Proteinmenge von Ü und D waren je 20 µg, von E1 10 µg und E2 25 µg. Als Proteinleiter diente die Color Prestained Protein Ladder P7712. **B**: Eluate der Reinigung von MccA-twS nach Kap. 5.8.6. Links sind Aliquots der Eluate, rechts das konzentrierte Eluat nach Kap. 5.8.7.

Zusätzlich zur Charakterisierung der Sulfitatmung der hier untersuchten Mutanten wurden die entsprechenden MccA-Varianten in *W. succinogenes* produziert und mithilfe des Twin-Strep-Tags mittels Affinitätschromatographie gereinigt (**Kap. 5.8.6**). Die durch Affinitätschromatographie gewonnenen Eluate zeigten eine für Cytochrome *c* charakteristische Orange-Rotfärbung (Abbildung 24B). MccA wurde sowohl mittels Coomassie- als auch Häm-Färbung in den Eluaten nachgewiesen (Abbildung 24A) und die Menge an Verunreinigungen im Eluat als vernachlässigbar gering beurteilt.

6.3.2. UV/Vis-Spektren von MccA

Zur Charakterisierung der optischen Eigenschaften von MccA wurden den gereinigten Twin-Strep-Tag fusionierten MccA-Varianten UV/Vis-Spektren aufgezeichnet (Abbildung 25). Das Spektrum von gereinigtem MccA ohne Zugabe von oxidierenden oder reduzierenden Substanzen („wie isoliert“) zeigte die für Häm *c*-Gruppen typische Soret-Bande bei 408 nm bis 409 nm sowie ein für oxidierte Cytochrome *c* typisches Maximum zwischen 528 nm und 529 nm. Nach Zugabe von Ferricyanid wurde keine Änderung des Spektrums beobachtet (nicht gezeigt). Nach Zugabe von Natriumdithionit hingegen verschob sich die Soret-Bande hin zu 421 nm bzw. 422 nm. Anstelle des Maximums bei 528 nm bis 529 nm erschienen eine α -Bande zwischen 521 nm und 522 nm sowie eine β -Bande bei 551 nm oder 552 nm. Schlussfolgernd lagen die Häm *c*-Gruppen des Proteins nach anaerober Reinigung oxidiert vor. Das UV/Vis-Spektrum von gereinigtem MccA-twS und die Spektren der veränderten Enzyme unterschieden sich nicht signifikant. Darüber hinaus wurde anhand der Absorptionen bei 551 nm und 540 nm die Zahl der Häm *c*-Gruppen pro Enzym abgeschätzt (Abbildung 25, Tabelle 25). Die Anzahl variierte hier zwischen 7,6 Häm *c*/Protein (MccA-twS) und 8,5 Häm *c*/Protein (MccA_C399A-twS).

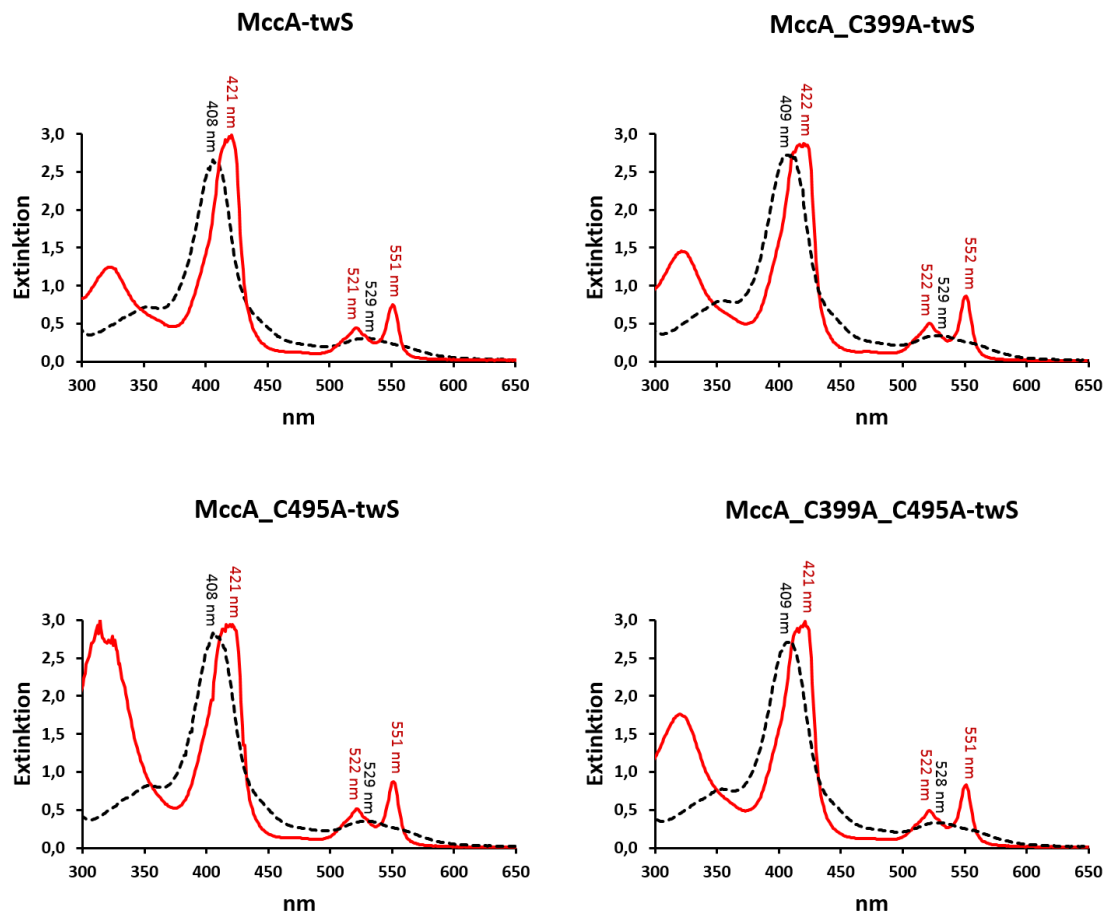


Abbildung 25. UV/Vis-Spektren des gereinigten MccA-twS sowie der Cystein-Austauschvarianten. Es wurden die Spektren des Enzyms „wie isoliert“ (schwarze gestrichelte Linie) und die des mit Natriumdithionit reduzierten Enzyms (rote Linie) überlagert. Die Wellenlängen der Maxima wurden hervorgehoben und je nach Zugehörigkeit zum Spektrum des nichtreduzierten oder des reduzierten MccA eingefärbt. Die Durchführung ist in **Kap. 5.9.7** beschrieben.

Tabelle 25. Bestimmung des Verhältnisses von Eisen zu Häm c von MccA-twS sowie der Cystein-Austauschvarianten. Die Proteinkonzentration wurde nach **Kap. 5.8.8** (Bradford), die Konzentration an Häm c nach **Kap. 5.9.8** bestimmt.

Protein	Protein-Konzentration [mg/mL]	Protein-Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]	Häm c-Konzentration [$\mu\text{mol/L}$]	Häm c/Protein
MccA-twS			28,0	7,6
MccA_C399A-twS	0,3	3,6	30,9	8,5
MccA_C495A-twS			31,1	8,4
MccA_C399A_C495A-twS			29,4	8,0

6.3.3. Gelfiltration von MccA

Mithilfe der in **Kap. 5.9.9** beschriebenen Gelfiltration wurde das Verhältnis zwischen MccA-Trimer und -Monomer von MccA-twS sowie dessen Cysteinaustausch-Varianten bestimmt. Das Gelfiltrations-Chromatogramm von MccA-twS zeigte zwei Maxima (Abbildung 26). Die bei geringerem Säulenvolumen detektierte Fraktion wurde der trimeren Form von MccA zugeordnet, während die später aufgefangene dem Monomer zugeschrieben wurde (vergleiche mit dem Standard in **Kap. 5.9.9**). Bei der Auftrennung von MccA_C399A-twS und MccA_C495A-twS wurden ebenfalls zwei Fraktionen voneinander unterschieden, welche bei dem für das Trimer und das Monomer erwarteten Säulenvolumen eluiert wurden. Da die dem Trimer und dem Monomer zugeordneten Signale nicht komplett voneinander getrennt im Chromatogramm vorlagen, waren allerdings keine zuverlässigen Integrale der Fraktionen bestimmbar. Das dem Trimer zugeordnete Signal besaß eine deutlich höhere Intensität, woraus geschlossen wurde, dass MccA-twS, MccA_C399A-twS und MccA_C495A-twS hauptsächlich als Trimer vorlagen. Für MccA_C399A_C495A-twS ließ sich hingegen nur eine Fraktion bei einem Volumen, welches für das Monomer erwartet wurde, nachweisen. Hier wurde auch eine weitere Schulter identifiziert, dessen Partikel aber hypothetisch eine geringere Masse als MccA-twS besitzen.

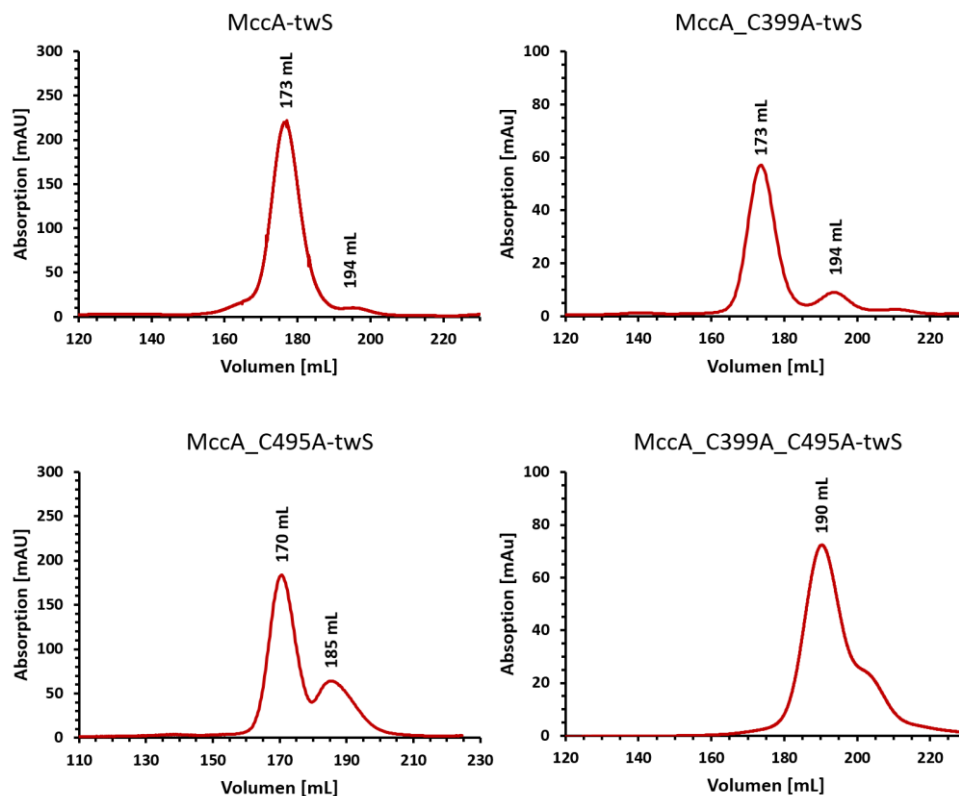


Abbildung 26. Gelfiltrations-Chromatogramm von gereinigtem MccA-twS sowie von MccA_C399A-twS, MccA_C495A-twS und MccA_C399A_C495A-twS nach **Kap. 5.9.9**. Die Volumina mit den höchsten Intensitäten wurden markiert.

6.3.4. Elektrokinetische Untersuchung von MccA

Für die Aktivität von MccA ist die Lieferung von Elektronen mit niedrigem Potential von der Interaktions-Stelle mit MccC und dem aktiven Zentrum und daher ein potential-abhängiger Elektronentransport zwischen den Häm-Kofaktoren notwendig. Zur Bestimmung der Redox-Potentiale der Häm c-Gruppen eignet sich die Proteinfilm-Voltammetrie. Gereinigtes MccA-twS und MccA_C399A-twS wurden im Folgenden mit dieser Methode charakterisiert. Das Protein assoziierte an der Elektrode und war zur Aufnahme und Abgabe von Elektronen fähig, sodass von dem so fixierten Protein Cyclovoltammogramme und Chronoamperogramme aufgezeichnet werden konnten (in Zusammenarbeit mit Dr. Daniel Tekverk und Prof. Sean Elliott, Boston University). Die Cyclovoltammetrie wurde zunächst ohne Substrat durchgeführt (Abbildung 27). Vor der elektrokinetischen Untersuchung der beiden Proteinvarianten gelang es, Kristalle der Proteine zu züchten. Die Auflösung der erhaltenen Kristalle genügte, um das Vorhandensein von Cu(I) durch das Auftauchen einer K-Kante in der Röntgenabsorption zu bestimmen. Während in Kristallen von MccA-twS die für Kupfer charakteristische K-Kante nachgewiesen werden konnte, war diese bei MccA_C399A-twS-Kristallen nicht vorhanden. Somit schien Cu(I) in der Cysteinaustausch-Variante zu fehlen (Abbildung 50 im Anhang).

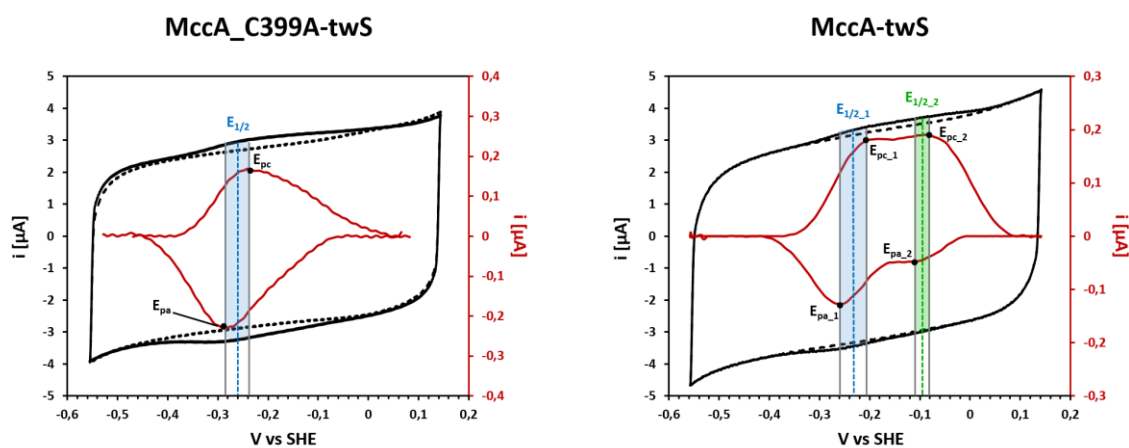


Abbildung 27. Proteinfilm-Voltammetrie ohne Substratumsatz. Die Methode ist in **Kap. 5.9.10** erläutert. Die schwarze durchgezogene Kurve stellt das Cyclovoltammogramm der Elektrode mit Proteinfilm dar, die schwarze gestrichelte Kurve zeigt das der Elektrode ohne Proteinfilm. Die rote Kurve entspricht dem Differenz-Cyclovoltammogramme des durchgezogenen und des gestrichelten Graphen. Die Anoden- (E_{pa}) und Kathodenpotentiale (E_{pc}) sowie das hieraus bestimmte Halbstufenpotential $E_{1/2}$ sind gekennzeichnet. Cyclovoltammogramme der Enzyme wurden bei einem pH von 7,1, einer Scanrate von 150 mV und einer Temperatur von 30 °C aufgezeichnet.

Tabelle 26. Die Werte in Abbildung 17 gekennzeichneten Potentiale. E_{pa} und E_{pc} in der MccA-twS 1 zugehörigen Zeile entsprechen E_{pa_1} und E_{pc_1} , E_{pa} und E_{pc} in der MccA-twS 2 zugeordneten Zeile entsprechen E_{pa_2} und E_{pc_2} in Abbildung 17.

Protein	E_{pa}	E_{pc}	$E_{1/2}$
MccA_C399A-twS	-0.286	-0.239	-0.263
MccA-twS 1	-0.263	0.206	-0.235
MccA-twS 2	-0.113	-0.086	-0.100

Die Proteinfilm-Voltammogramme von MccA-twS und MccA_C399A-twS zeigten auf dem oxidativen (negative Stromstärke) sowie auf dem reduktiven Ast (positive Stromstärke) breite Peak-Potentiale, welche von -300 bis -75 mV reichten. Von dem Cyclovoltammogramm mit und ohne fixiertem Protein konnte durch Subtraktion ein Differenzspektrum erhalten werden, in welchem die Anoden- (E_{pa}) und Kathodenpotentiale (E_{pc}) identifiziert werden konnte (Abbildung 27 rote Graphen). Während das Differenzspektrum von MccA-twS jeweils zwei Maxima auf dem oxidierten und ein Maximum auf dem reduzierten Ast besaßen (Abbildung 27A), zeigte das Differenzspektrum von MccA_C399A-twS jeweils nur ein Maximum auf dem oxidierten und dem reduzierten Ast (Abbildung 27B). E_{pa} und E_{pc} im Spektrum von MccA_C399A-twS sind 23 bzw. 33 mV negativer als korrespondierende E_{pa} und E_{pc} von MccA-twS (Tabelle 26), lagen diesen Werten aber signifikant näher als dem zweiten E_{pa} und E_{pc} . Diese beiden weiteren Potentiale wurden im Folgenden als E_{pa_2} und E_{pc_2} bezeichnet und einer zweiten redoxaktiven Spezies in MccA-twS zugeordnet. Das negativere Halbstufenpotential von MccA-twS war mit -235 mV etwa 28 mV positiver als das Halbstufenpotential von MccA_C399A-twS mit -263 mV, das positivere Halbstufenpotential betrug -100 mV.

MccA reduziert neben dem Substrat Sulfit auch Nitrit, dessen Reduktion ebenfalls 6 mol Elektronen pro mol Substrat benötigt. Um Unterschiede im Reduktionsverhalten dieser Substrate zu identifizieren, wurden Cyclovoltammogramme von MccA-twS und MccA_C399A-twS in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Sulfit oder Nitrit aufgezeichnet (Abbildung 28).

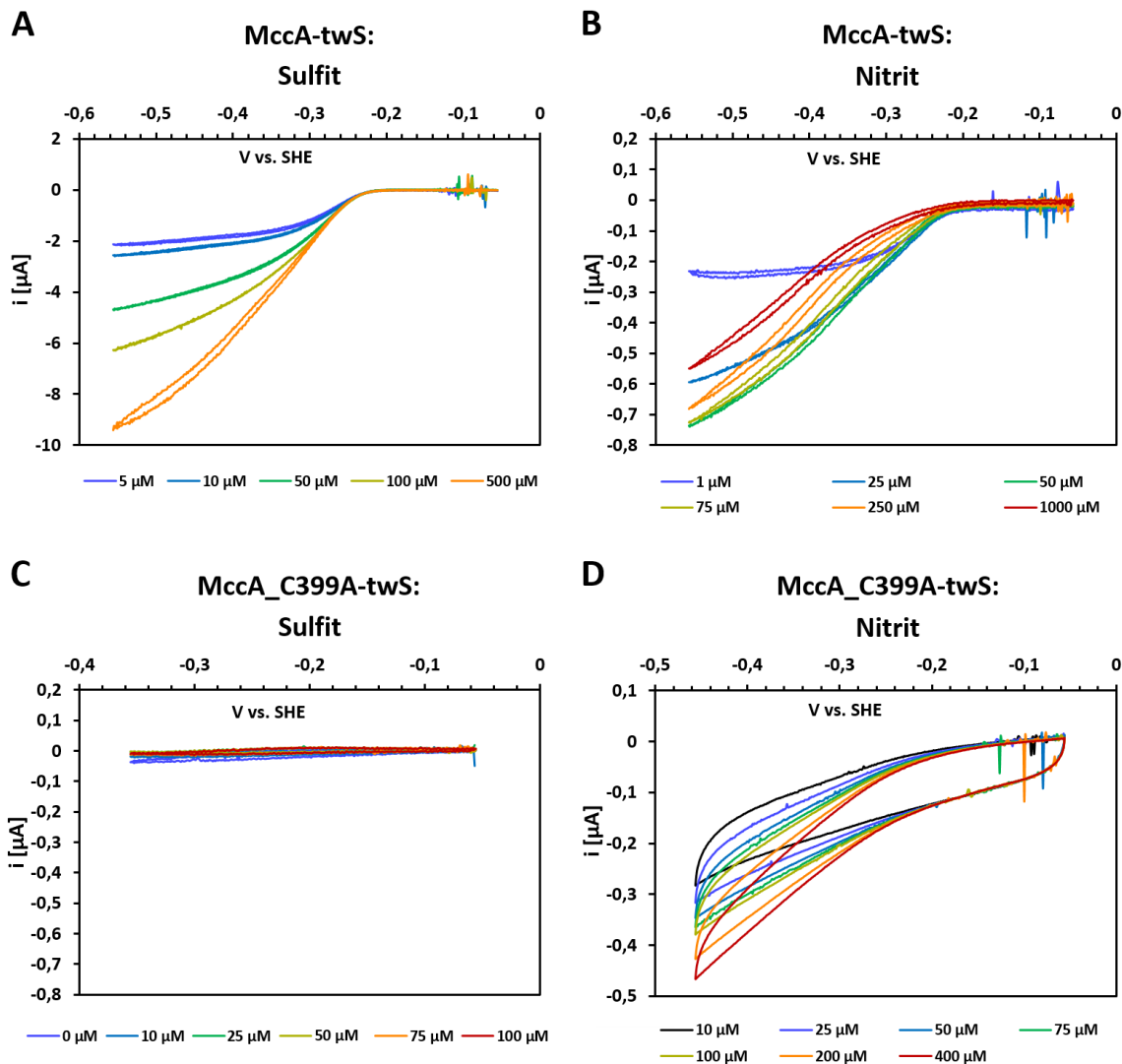


Abbildung 28. Substratabhängige Proteinfilm-Voltammetrie von MccA-twS und MccA_C399A-twS. Die dargestellten Diagramme sind die Differenz aus dem jeweiligen Voltammogramm mit der in der Legende angegebenen Substratkonzentration und dem ohne Substrat (Differenz-Cyclovoltammogramme). Cyclovoltammogramme wurden bei pH 7,1, 26 °C und einer Scanrate von 10 mV/s aufgezeichnet.

Bei Zugabe von Sulfit zu MccA-twS stieg der Betrag der Stromstärke (i.e. die Stromstärke wurde negativer) unterhalb von -250 mV vs. SHE mit fallender Spannung, was die Reduktion von Sulfit anzeigte (Abbildung 28A). Die Rate, mit der der Betrag der Stromstärke unterhalb dieser Spannung zunahm, korrelierte mit der Konzentration an eingesetztem Sulfit. Bei Einsatz von Substrat waren aber keine Spitzenpotentiale identifizierbar, was die Bestimmung des Halbstufenpotentials (der Durchschnitt der Spitzenpotentiale der Reduktion des Substrates und der korrespondierenden Rückreaktion) für die Katalyse nicht möglich machte. Wurde Nitrit anstelle von Sulfit als Substrat eingesetzt, so zeigte sich für Konzentrationen zwischen 1 μM und 50 μM ein analoges Verhalten, wenngleich auch mit signifikant geringerer Stromstärke,

was durch eine geringere katalytische Aktivität für Nitrit gegeben war (Abbildung 28B) [11]. Die höchste Aktivität zeigte sich bei einer Nitrit-Konzentration bei $50 \mu\text{M}$ bzw. $75 \mu\text{M}$. Oberhalb dieser nahm die Stromstärke mit fallender Spannung weniger stark zu und mit weiter steigender Nitrit-Konzentration wurde MccA-twS immer inaktiver. MccA_C399A-twS zeigte mit Sulfid keine enzymatische Aktivität (Abbildung 28C). Wurde MccA_C399A-twS mit Nitrit inkubiert, so ist auch diese Proteinvariante zur Nitritreduktion in der Lage. Im Gegensatz zu MccA-twS kam es bei MccA_C399A-twS bei hoher Nitritkonzentration nicht zu einer Substrat-Inhibierung im Rahmen der getesteten Nitritkonzentration bis zu $400 \mu\text{M}$ (Abbildung 28D).

Zusätzlich zur Proteinfilm-Voltammetrie wurde mit MccA-twS und MccA_C399A-twS eine Chronoamperometrie durchgeführt (Abbildung 29). Hierbei wird bei konstanter Spannung die Stromstärke in Abhängigkeit der Zeit bestimmt. Stufenweise erhöhte Konzentrationen an Substrat geben Aufschluss über die Substratkonzentrations-abhängige Enzymaktivität. Bei MccA-twS erhöhte sich der Betrag der Stromstärke mit sukzessiv steigender Konzentration an Sulfid und blieb bis zur weiteren Konzentrationserhöhung konstant. Das Enzym setzte somit mit konstanter Rate Sulfid um. Bei Zugabe von mehr als $25 \mu\text{M}$ Nitrit sank nach Zugabe der Betrag der Stromstärke ab. Die hieraus geschlussfolgerte Abnahme der Enzymaktivität wurde mit steigender Nitritkonzentration immer prominenter. In der Chronoamperometrie setzte MccA_C399A-twS das vorgelegte Nitrit um. Wie in der Proteinfilm-Voltammetrie wurde auch hier keine Substrat-Inhibierung von MccA_C399A-twS durch Nitrit festgestellt.

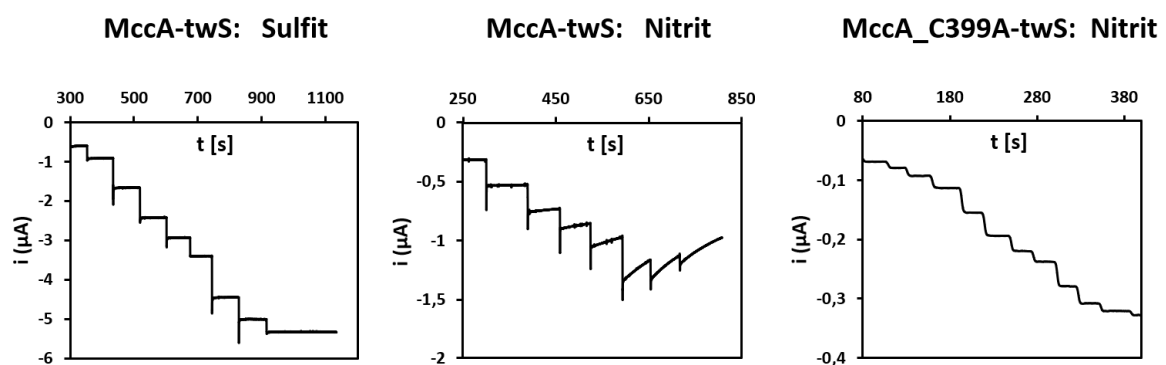


Abbildung 29. Chronoamperometrische Messung von MccA-twS und von MccA_C399A-twS mit den Substraten Sulfid oder Nitrit. Daten wurden bei pH 7,1, $26 \text{ }^\circ\text{C}$ und -456 mV vs. SHE aufgenommen. Die Scan-Rate betrug 3 krpm . MccA-twS wurde stufenweise mit steigenden Konzentrationen an Substrat von $5 \mu\text{M}$ bis 1 mM Sulfid, oder mit $5 \mu\text{M}$ bis 1 mM Nitrit versetzt (im Chronoamperogramm von links nach rechts). MccA_C399A-twS wurde schrittweise mit $1 \mu\text{M}$ bis $800 \mu\text{M}$ Nitrit versetzt. Genauereres hierzu in Kap. 5.9.11.

6.3.5. Diskussion

MccA-twS wurde in früheren Arbeiten in *W. succinogenes* MccA 2xStrep unter Kontrolle des Fumaratreduktase-Promotors [11][12], in Zuge dieser Arbeit hingegen unter Kontrolle des nativen *mcc*-Promotorelementes produziert. Kulturen, welche Sulfit mittels MccA-twS in Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium atmeten, waren hierzu wie Kulturen mit dem Wildstamm-Enzym fähig, was dafürsprach, dass das C-terminale zusätzliche Peptid die Faltung oder die Interaktion des Enzyms nicht beeinträchtigte. Die physiologischen Resultate demonstrierten die Notwendigkeit beider Cystein-Reste für die Sulfitreduktase-Aktivität. Unerwartet war, dass die Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ mcca_C399A-twS* und *W. succinogenes mccR⁺ mcca_C495A-twS* trotz Ausbleiben der Sulfitreduktion signifikant höher wuchsen als Kulturen von *W. succinogenes ΔmccA::kan*. Darüber hinaus verbrauchten Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ mcca_C399A-twS* mit 37 mM deutlich weniger Formiat als solche von *W. succinogenes mccR⁺ mcca_C495A-twS* und *W. succinogenes mccR⁺ mcca_C399A_C495A-twS* mit je etwa 45 mM Formiat. Die Ursache für diesen Befund ist nicht klar. Die Reinigung von MccA-twS sowie der Cysteinaustausch-Varianten mittels Affinitätschromatographie lieferte relativ reines Protein ohne signifikanten Anteil von leichteren Fraktionen. Das Protein schien somit stabil zu sein und eignete sich für die weitere Charakterisierung Die UV/Vis-Spektren stimmten mit dem von zuvor aufgezeichnetem Spektrum anaerob gereinigtem MccAs überein [13]. Bis auf eine eventuelle Verbreiterung der Soret-Bande, welche allerdings auch ein Artefakt durch die hohe Absorption sein kann, unterschieden sich die Spektren von MccA-twS und die der Cysteinaustausch-Varianten nicht voneinander. Würde Cu(I) mit einer der Häm c-Gruppen interagieren, so würde dies die spektroskopischen Eigenschaften des im aktiven Zentrum befindlichen Häm c 2 ändern. In diesem Fall wäre bei MccA-twS eine Verbreiterung oder eine Schulter bei einer oder mehrerer der Maxima zu erwarten. Dass die optischen Spektren von MccA-twS und die der Cysteinaustausch-Varianten sich nicht voneinander unterschieden, sprach dafür, dass das Cu(I) keine Interaktion mit dem katalytisch aktiven Häm c eingeht.

Die Bestimmung des Kupferanteils bestätigte die Hypothese, dass für die Bindung von Cu(I) zumindest der Cystein-Rest C399 notwendig ist. Im Zusammenhang mit der Charakterisierung der Mutanten in **Kap. 6.3.1** ist es wahrscheinlich, dass keine der Cysteinaustausch-Mutanten Cu(I) besaß. Im Folgenden konnte also Enzym mit Cu(I) im aktiven Zentrum (MccA-twS) und solches ohne Cu(I) (MccA_C399A-twS) nach Isolierung miteinander verglichen werden. Bereits die cyclovoltammetrischen Spektren ohne Substrat zeigten Unterschiede zwischen der Cu(I)-beladenen und Cu(I)-losen Proteinvariante. Im Gegensatz zum Differenzspektrum von MccA_C399A-twS mit zwei Maxima und einem Halbstufenpotential zeigte das von MccA-twS vier Maxima, welche zwei Halbstufenpotentialen und somit zwei redoxaktiven Spezies

zugeordnet werden könnten. Durch Involvierung des Cu(I) im aktiven Zentrum als weitere redoxaktive Spezies könnte ein weiteres Paar E_{pa}/E_{pc} zustande kommen. Bei Reduktion bzw. Oxidation des Cu(I) während der Cyclovoltammetrie ohne Substrat wäre bei MccA-twS jeweils ein zusätzliches Maximum auf dem oxidativen und dem reduktiven Ast und somit ein komplexeres Spektrum zu erwarten gewesen. Das Halbstufenpotential dieses zusätzlichen Peaks liegt bei etwa -100 mV vs. SHE. Ob besagtes Halbstufenpotential plausibel für das im aktiven Zentrum gebundene Cu(I) ist, kann nur schwer vorausgesagt werden. Die cyclovoltammetrische und chronoamperometrische Charakterisierung der Proteinvarianten bestätigt das Ergebnis der biologischen Charakterisierung für Sulfit. Wie in **Kap. 4.2.2** erwähnt, ermöglicht Cu(I) die Sulfitreduktion hypothetisch dadurch, dass anstelle von Sulfit SO_2 im aktiven Zentrum bindet. Da MccA_C399A-twS keine mit Sulfit als Substrat keine Aktivität zeigte, wurde geschlussfolgert, dass Cu(I) tatsächlich für die Sulfitreduktion notwendig ist. Sofern Cu(I) tatsächlich die Sulfitbindung verhindert, die SO_2 -Bindung aber erlaubt, ist MccA eine SO_2 -Reduktase, welche durch den zusätzlichen Kofaktor auch Sulfit als Substrat verwendet. Bei Nitrit-Umsatz durch MccA_C399A-twS wurde verglichen mit MccA-twS ein geringerer Betrag der Stromstärke festgestellt, was entweder durch eine geringere katalytische Aktivität oder durch einen geringeren Anteil an aktivem Protein in der verwendeten Probe erklärt werden kann. Während bei MccA-twS durch Nitrit ab einer Konzentration von 50 mM eine mit steigender Nitrit-Konzentration stärkere Substratinhibierung beobachtet wurde, kam es bei der Cysteinaustausch-Variante ohne Cu(I) nicht zur Substratinhibierung. Ohne das Cu(I) im aktiven Zentrum war MccA-twS zwar nicht zur Sulfitreduktion in der Lage, erfuhr allerdings auch keine Inhibierung durch hohe Nitrit-Konzentrationen. Dies macht das Cu(I) zu einem Substrat-entscheidenden Kofaktor. Zu den ähnlichsten MccA-Orthologen zählen Proteine der Cytochrome c_{554} -Proteinfamilie, welche entweder im Elektronentransport involviert oder als NO-Reduktasen beschrieben wurden [12][63][64]. Somit ist es möglich, dass der letzte gemeinsame Vorfahre von MccA und Cytochrom c_{554} eine NO-Reduktase gewesen sein könnte, dessen Substratspezifität sich bei dem Vorfahren der MccA-Proteine allerdings zu Sulfit änderte. Nach Evolution des Cu(I)-Bindemotives zusammen mit dessen Bindung von Cu(I) wurde dann die Bindung von Sulfit verhindert und stattdessen nur die Bindung von SO_2 erlaubt. Dies konnte es diesem Enzym ermöglicht haben, SO_2 und somit indirekt Sulfit zu reduzieren.

6.4. Der MccCD-Komplex

6.4.1. Struktur und Funktion von MccC und MccD

Wie in **Kap. 6.2** gezeigt, sind für die Funktion des Mcc-Systems die Genprodukte von *mccC* und *-D* unerlässlich, welche hypothetisch den membranständigen MK- oder 8-MMK-Dehydrogenase-Komplex bilden. Die Modelle von MccC und *-D* wurden mittels I-Tasser nach den Strukturen von PsrB und *-C* von *Thermus thermophilus* modelliert, um deren Interaktion und dreidimensionale Struktur vorherzusagen [46][48]. In Pymol wurde anschließend MccC an PsrB und MccD an PsrC ausgerichtet. PsrB und *-C* wurden beide aus Pymol entfernt, aber der Kofaktor MK7 beibehalten. Die empirisch bestimmte Chinon-Bindetasche von PsrC und das Modell der Chinon-Bindetasche von MccD lagen nach der Ausrichtung an gleicher Position und MK7 entsprechend in der Chinon-Bindetasche von MccD (Abbildung 30C). In der ermittelten dreidimensionalen Struktur von MccC und *-D* wurde nach Aminosäure-Resten gesucht, welche aufgrund ihrer Position der Elektronentransport entweder zwischen einzelnen [4Fe4S]-Zentren, oder zwischen einem dieser Kofaktoren und dem Chinon-Bindepzentrum von MccD vermitteln könnten (Abbildung 30). Darüber hinaus wurde zur Identifikation von konservierten und somit möglicherweise für die Funktion wichtigen Resten die Primärstruktur von MccC mit aus anderen *mcc*-Clustern vorhergesagten Orthologen verglichen.

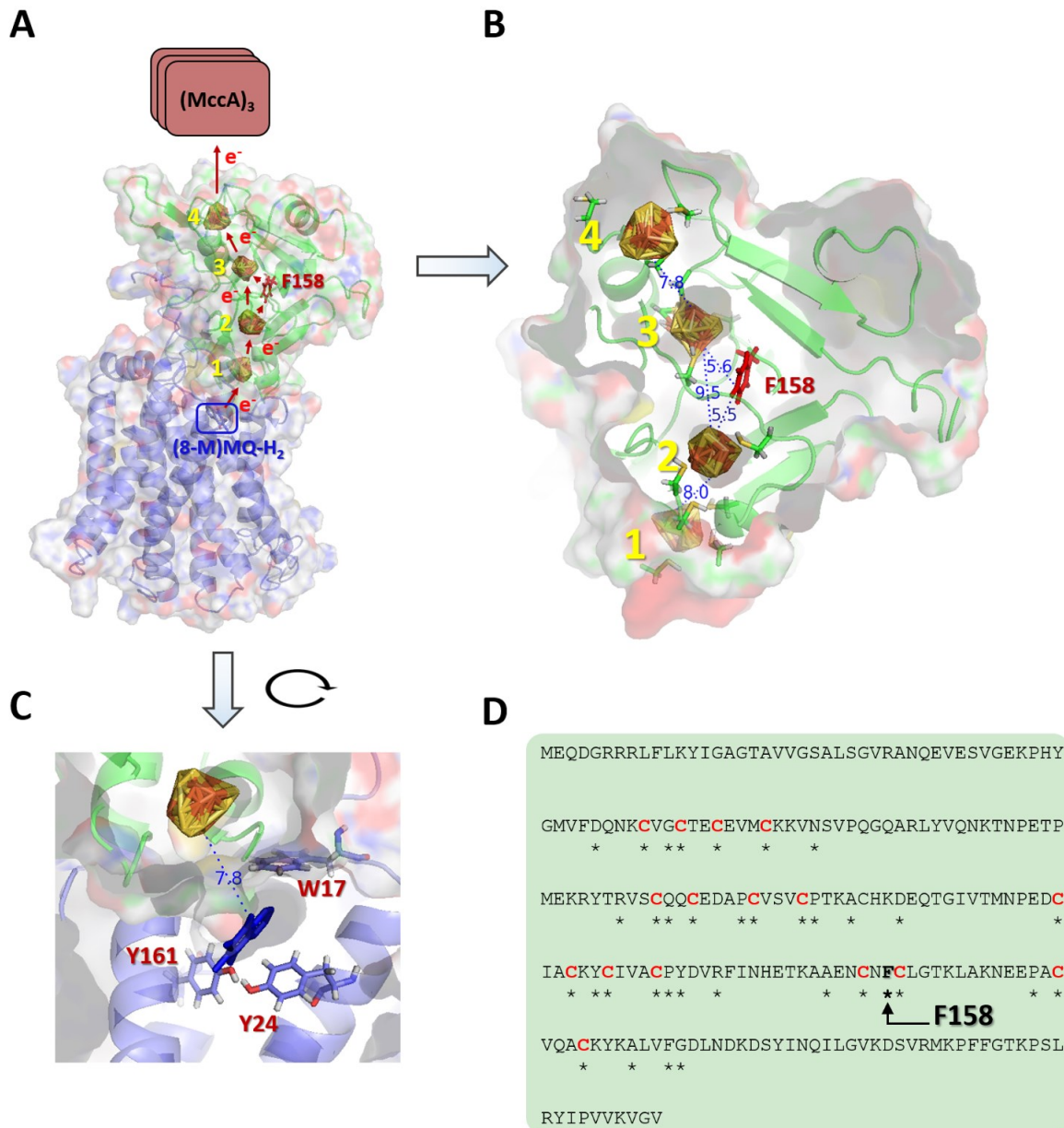


Abbildung 30. Modell der Tertiärstrukturen von MccC und MccD. **A:** modellierte Strukturen des Heterodimers MccCD und hypothetischer Elektronentransport vom Menachinol zu MccA. Der putative Elektronentransportweg von MccD über MccC zu MccA ist mit roten Pfeilen dargestellt. Die Gabelung zwischen den [4Fe4S]-Zentren 2 und 3 zeigt alternative Wege: entweder direkt zwischen den Zentren 2 und 3, oder über den Rest F158. **B:** relevanter Ausschnitt von MccC. Die Abstände (in Å) zwischen den [4Fe4S]-Zentren sowie zwischen F158 und den beiden am nächsten liegenden Zentren sind eingezeichnet. **C:** Gegenüber **A** um etwa 90° in der Transversalebene nach rechts gedrehter Ausschnitt der Chinon-Bindetasche von MccD. Die mit der Menachinon-Bindung assoziierten Aminosäuren W17, Y24 und Y161 sind markiert und der Abstand (in Å) zwischen der Ketogruppe an Kohlenstoff 1 von MK7 und dem nächsten [4Fe4S]-Zentrum gekennzeichnet. **D:** Sequenz von MccC ohne Signalpeptid. Die in den 110 MccC-Orthologen absolut konservierten Reste sind mit Sternchen annotiert (Vergleich der Sequenzen in Abbildung 51 im Anhang). Cystein-Reste, welche die [4Fe4S]-Zentren binden, sind rot und fett dargestellt. F158 ist fett und unterstrichen kenntlich gemacht worden. Für die Erstellung der Abbildung siehe **Kap. 5.11.1**.

Die N-terminalen Abschnitte und das Chinon-Bindezentrum des Strukturmodells von MccD und der Struktur von PsrC besaßen eine ähnliche Architektur der Chinon-Bindetasche. MK7 lag nach Entfernung der PsrC-Struktur in der Chinon-Bindetasche von MccD vor. Nahe des MK7 lagen drei aromatische Reste, deren korrespondierenden Reste in PsrC für die Substratoxidation wichtig sind [48]. Das Chinon und das nächste [4Fe4S]-Zentrum von MccC lagen etwa 7,8 Å voneinander entfernt, was vergleichbar mit den Abständen der [4Fe4S]-Zentren untereinander war (7,8 bis 9,5 Å) (Abbildung 30B, C). F158 befand sich im ermittelten Strukturmodell von MccC nahe der beiden im Proteinzentrum liegenden [4Fe4S]-Zentren. Dieser Aminosäurerest ist in homologen Sequenzen konserviert (Abbildung 30D), was auf eine wichtige Rolle entweder in der Aufrechterhaltung der Struktur oder der Funktion von MccC hindeutet. Besagte Aminosäure wurde in MccC zum einen durch den nichtaromatischen Leucin-Rest (*W. succinogenes mccR⁺ mccC_F158L-twS*), sowie durch den ebenfalls aromatischen Tryptophan-Rest substituiert (*W. succinogenes mccR⁺ mccC_F158W-twS*), welcher durch seine Größe aber die Konformationen der umliegenden Aminosäure-Reste beeinflussen könnte. Die Mutante *W. succinogenes mccR⁺ mccC-twS* produzierte Wildstamm-MccC mit dem Twin-Strep-Tag und wurde als Kontrolle ebenfalls auf dessen Fähigkeit zur Sulfitatmung hin untersucht.

Kulturen der MccC-twS produzierenden Mutante verhielten sich auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium wie *W. succinogenes mccR⁺ cat* (Abbildung 31A, B, E). Auch die Umsatzraten der Zellsuspensionen für Formiat, Sulfit und Sulfid wichen nicht signifikant von denen von *W. succinogenes mccR⁺ cat* ab (Tabelle 27). Im Gegensatz hierzu war die Sulfitatmung der Zellen von *W. succinogenes mccR⁺ mccC_F158L-twS* stark vermindert (Abbildung 31C). Sulfit wurde bei diesen Kulturen erst nach 24 h nachweisbar verbraucht. Die in Zellsuspensionen ermittelten Umsatzraten für Formiat, Sulfit und Sulfid von *W. succinogenes mccR⁺ mccC_F158L-twS* entsprachen nur 11 bis 12 % der von *W. succinogenes mccR⁺ mccC-twS*. Zellen der Mutante *W. succinogenes mccR⁺ mccC_F158W-twS* reduzierten Sulfit schneller als *W. succinogenes mccR⁺ mccC_F158L-twS*, waren verglichen mit *W. succinogenes mccR⁺ cat* aber eingeschränkt. Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ mccC_F158L-twS* und von *W. succinogenes mccR⁺ mccC_F158W-twS* wuchsen auf eine etwa gleich hohe optische Dichte, aber signifikant höher als Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ ΔmccC::kan* (Abbildung 31B, Tabelle 27). In Zellsuspensionen betrugen die Umsatzraten zwischen 74 und 78 % der entsprechenden Raten von *W. succinogenes mccR⁺ mccC-twS* und waren somit deutlich höher als die von *W. succinogenes mccR⁺ mccC_F158L-twS*. Der immunologische Nachweis in *W. succinogenes*-Zellen misslang sowohl für MccC-twS, als auch die F158-Varianten. Einhergehend hiermit war es weder möglich, das Vorhandensein von stabilem MccC_F158L-twS und MccC_F158W-twS in

den entsprechenden Mutanten unter Sulfitatmung nachzuweisen, noch, diese Proteine zu isolieren.

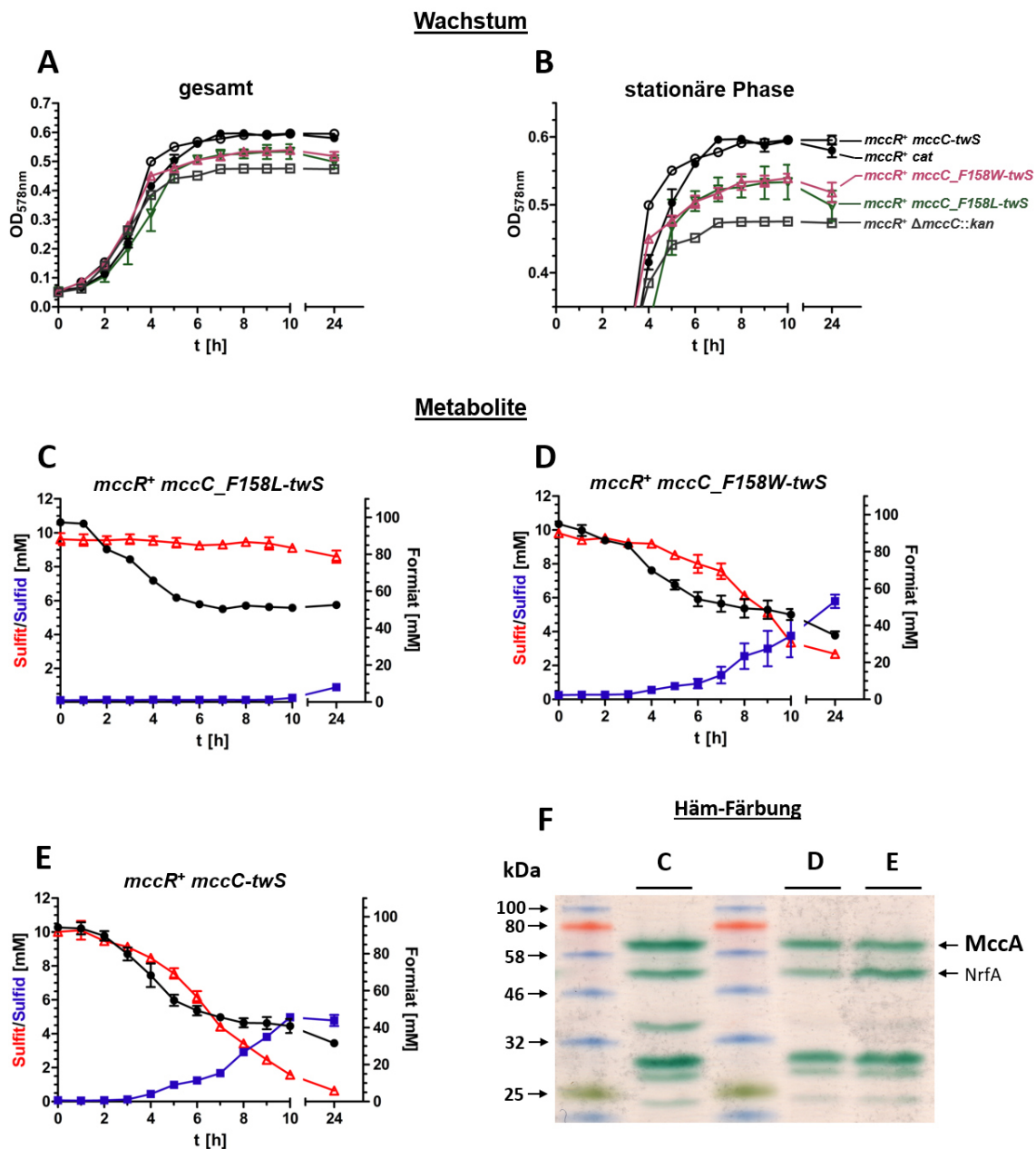


Abbildung 31. Charakterisierung der Sulfitatmung der Mutante *W. succinogenes* *mccR⁺ mccC-twS* sowie der F158-Mutanten auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium. **A+B**: Wachstumskurven der Mutanten (**A**) sowie ein Ausschnitt des Übergangs in die stationäre Phase gezeigt (**B**). **C–E**: Konzentrationen von Formiat, Sulfit sowie Sulfitd der jeweiligen *mccC*-Mutante. **F**: Nachweis von MccA in Zellen der *mccC*-Mutanten. Kulturen der Mutanten wuchsen für 10 h auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium. 100 μ g Protein an Zell-Lysat pro Spur wurden mittels SDS-PAGE in einem 12,5 % (w/v)-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend wurden Cytochrome *c* mittels Häm-Färbung detektiert. Als Proteinleiter diente die Color Prestained Protein Ladder P7712.

Tabelle 27. Charakterisierung des Wachstums und der Sulfitatmung von *W. succinogenes mccR⁺ cat* sowie der *mccC*-Mutanten auf Medium mit 100 mM Formiat, 45 mM Fumarat und 10 mM Sulfit. Erreichte OD₅₇₈, Verdopplungszeiten sowie Sulfit-, Formiat-Verbrauchs- und Sulfid-Produktionsraten von Zellsuspensionen in der frühen stationären Phase (Kap. 5.10.2) sind aufgelistet. Jeder Mittelwert und dessen Standardabweichung wurde mithilfe von 3 biologischen Replikaten bestimmt.

Stamm/Mutante	OD ₅₇₈ in der stationären Phase ¹	Verdopplungszeit [min] ¹	Verbrauchsrate	Verbrauchsrate	Produktionsrate
			Formiat	Sulfit	Sulfid
			[nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹]		
<i>mccR⁺ mccC-twS</i>	0,596 ± 0,009	63 ± 2	260 ± 16	69 ± 9	58 ± 3
<i>mccR⁺ mccC_F158L-twS</i>	0,502 ± 0,006	78 ± 10	29 ± 5	8 ± 1	7 ± 1
<i>mccR⁺ mccC_F158W-twS</i>	0,536 ± 0,044	69 ± 13	192 ± 22	54 ± 4	54 ± 4

¹Die OD₅₇₈ nach 24 h Inkubation und die Verdopplungszeit wurden anhand der Werte, welche optische in den Wachstumskurven dargestellt sind, errechnet (siehe Formel (6) in Kap. 5.10.1).

6.4.2. Heterologe Produktion und Reinigung von MccC

Im Folgenden wurden die MccC-Varianten heterolog in *E. coli* C41(DE3) produziert. Um die Löslichkeit von MccC zu erhöhen und die Beladung mit [4Fe-4S]-Zentren zu verbessern, wurde *mccC* als *malE*-Fusionsgen in das Plasmid pPR IBA 1 ligiert. Bei beiden Leserahmen wurde die Signalsequenz für den Export entfernt, um das reife Fusionsprotein im reduzierenden Cytoplasma zu halten. Es wurde direkt stromab des T7-Promotors integriert, was die IPTG-kontrollierte Expression in T7-Polymerase produzierenden Zellen ermöglichte (Tabelle 5). Zwischen beide Proteine wurde eine Peptidsequenz, welche von der Tabakmosaikvirus-Protease (TEV) erkannt und gespalten werden kann, eingeschoben. Das produzierte Genprodukt von *malEΔ1-20-TEV-mccCΔ1-32-strep* wird im Folgenden als MBP-TEV-MccC-Strep bezeichnet. Die Produktion von mit [4Fe4S]-Zentren beladenem MBP-TEV-MccC-Strep war durch Dunkelfärbung der Zellen nach Induktion erkennbar (Abbildung 32A). Sowohl MBP-TEV-MccC-Strep als auch die F158-Varianten ließen sich so produzieren und wurden mittels Sepharin-Dextrose-Säule gereinigt. Die Eluate zeigten ebenfalls die für [4Fe-4S]-Zentren enthaltenen Proteine typische Braunfärbung. Die Elution von Protein wurde mittels Coomassie-Färbung (Abbildung 32B), die Identität der Proteine mittels Immunodetektion bestätigt (Abbildung 32C). Die erwartete Größe des intakten Fusionsproteins betrug zwischen 65,0 (für MBP-TEV-MccC-Strep und MBP-TEV-MccC_F158L-Strep) und 65,1 kDa (für MBP-TEV-MccC_F158W-Strep).

Neben dem intakten Fusionsprotein oberhalb der 58 kDa-Fraktion der Proteinleiter wurden zusätzliche Fraktionen mit geringerer Masse identifiziert. Da diese ebenfalls mittels MBP-spezifischer Immunodetektion nachgewiesen werden konnten, liegt es nahe, dass es sich um Proteolyseprodukte mit unvollständigem MccC. Die aufgetrennten Lysate des Durchflusses der Säule besaßen beide eine sowohl im Coomassie-gefärbten Gel als auch durch Immunodetektion nachweisbare dem MBP-TEV-MccC-Strep zugeordnete Fraktion. Diese besaß aber eine deutlich geringere Intensität als die korrespondierende Fraktion im Überstand.

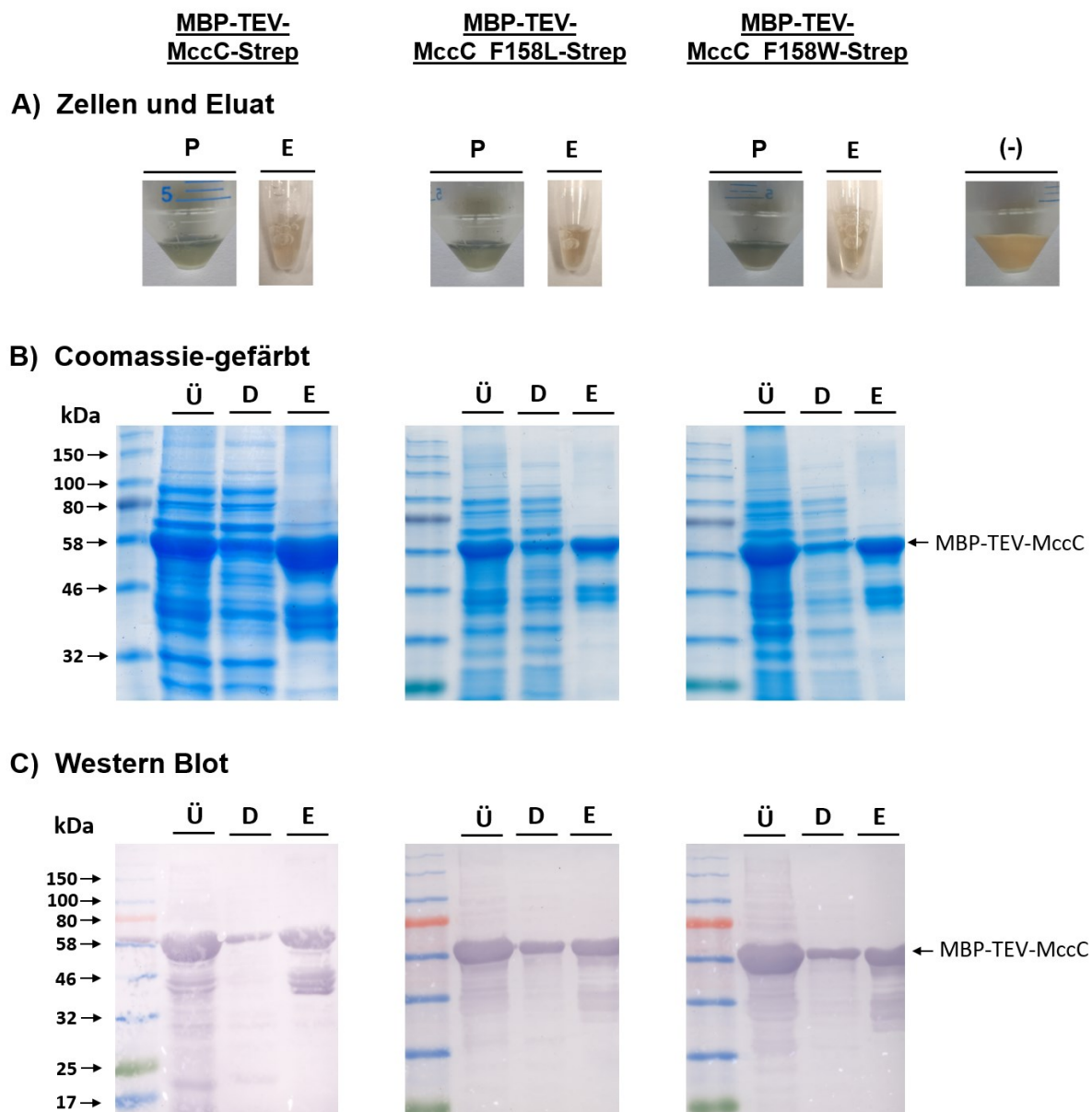


Abbildung 32. Nachweis von MBP-TEV-MccC-Strep, MBP-TEV-MccC_F158L-Strep und MBP-TEV-MccC_F158W-Strep. **A)** Zellepellets 16 h nach Induktion (**P**) und Eluat (**E**) von *E. coli* C43(DE3). Zum Vergleich wurde das Pellet von genauso behandelten Zellen, welche pPR1 ohne ligiertes Gen (-) besaßen, gezeigt. **B)** Coomassie-gefärbte Gele. Pro Spur wurden 30 μ g Protein des Überstandes nach Aufschluss und Zentrifugierung von MBP-TEV-MccC-Strep produzierenden Zellen (**Ü**), des Durchflusses der Säule

(D) sowie des Eluates (E) aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. C) Immunologischer Nachweis von MBP-TEV-MccC-Strep. Die aufgetragenen Proben korrespondieren mit jenen des Coomassie-gefärbten Gels. Mittels Western Blot fixiertes Protein wurde immunologisch mittels HRP-konjugierten Anti-MBP Monoclonal Antibody nachgewiesen. Als Proteinleiter diente die Color Prestained Protein Ladder P7712.

6.4.3. Eisenbeladung von MBP-TEV-MccC-Strep

Für die Untersuchung der Interaktion zwischen MccC und MccA ist ein mit Kofaktor beladenes MccC notwendig, welches alle vier [4Fe-4S]-Zentren enthält.. Daher wurde die Beladung der verschiedenen isolierten MccC-Derivate mit Eisen quantifiziert (Tabelle 28).

Tabelle 28. Bestimmung des Verhältnisses zwischen Eisen und Protein der MccC-Varianten. Die Proteinkonzentration wurde nach Kap. 5.8.8 (Bradford), die Eisen-Konzentration nach Kap. 5.9.6 quantifiziert.

Probe	Protein[mg/mL]	Protein [nmol/L]	Fe [nmol/L]	Fe/Protein ¹
MBP-TEV-MccC-Strep	2,1 ± 0,1	32,5 ± 1,8	267,3 ± 10,0	8,3 ± 0,5
MBP-TEV-MccC_F158L-Strep	2,2 ± 0,1	33,2 ± 1,8	277,0 ± 10,7	8,3 ± 0,1
MBP-TEV-MccC_F158W-Strep	2,1 ± 0,2	31,7 ± 2,9	285,5 ± 8,1	9,1 ± 0,8

¹Die Standardabweichung des Verhältnisses entspricht der Standardabweichung der drei berechneten Eisen-zu-Protein-Verhältnisse aus den drei technischen Replikaten.

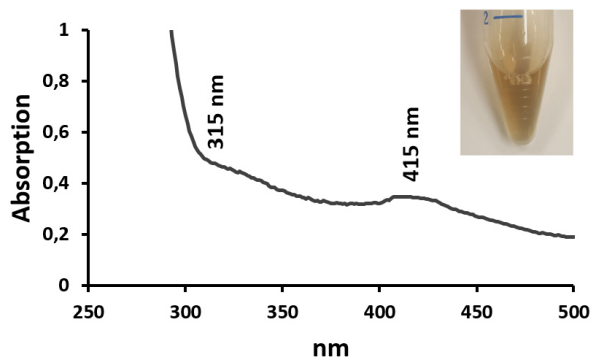
Als Mitglied der PsrC-Proteinfamilie sollte MccC über vier [4Fe4S]-Zentren verfügen, was auch durch das Vorhandensein der vier konservierten [4Fe4S]-Bindemotive vorausgesagt wird (Abbildung 30). Dies entspräche einem Verhältnis von 16 mol Eisen pro mol Protein. MBP-TEV-MccC-Strep sowie die F158-Mutanten besaßen zwischen 8,3 und 9,1 mol Eisen pro mol Protein. Es könnte angenommen werden, dass das MBP-TEV-MccC-Strep „wie isoliert“ über durchschnittlich zwei [4Fe4S]-Zentren verfügte, obwohl auch ein Teil des nachgewiesenen Eisens in [2Fe2S]-Zentren vorgelegen haben könnte (Näheres in der Diskussion). In jedem Fall lag das Protein Produktion nicht vollständig mit Kofaktor beladen vor.

6.4.4. Rekonstitution mit Eisen-Schwefel-Zentren

Um die fehlenden [4Fe4S]-Zentren *in vitro* zu rekonstituieren, wurde Protein mit DTT und β-ME inkubiert und im Folgenden schrittweise mit (NH₄)₂Fe(II)(SO₄)₂ sowie Na₂S versetzt, wie in Kap. 5.9.12 beschrieben. Nach dem Zusammenmischen des Ansatzes färbte sich dieser rasch dunkel (Abbildung 33), ohne dass wie in der Kontrolle ohne Protein unmittelbar Eisensulfid ausfiel (nicht gezeigt). Nach Inkubation über Nacht war überschüssiges Fe(II) und Sulfid als Eisensulfid ausgefallen und konnte durch Zentrifugierung vom Protein getrennt werden. [4Fe4S]-Zentren besitzen spezifische wellenlängenabhängige Absorptionsmaxima, welche sich

mittels UV/Vis-Spektrums identifizieren lassen. Das Spektrum von MBP-TEV-MccC-Strep wies zwischen 300 nm und 500 nm eine Schulter bei etwa 315 nm sowie ein Maximum bei 415 nm auf, welche für Proteine mit [4Fe4S]-Zentren typisch sind (Abbildung 33).

wie isoliert



rekonstituiert

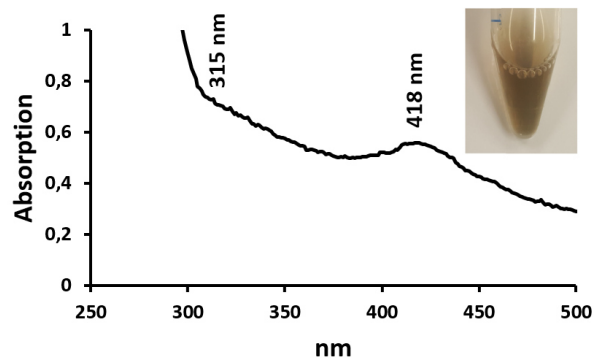


Abbildung 33. UV/Vis-Spektrum von MBP-TEV-MccC vor und nach Rekonstitution nach **Kap. 5.9.12**. Das Protein vor der Rekonstitution wurde zuvor bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und einmal getaut. Rechts oben im Spektrum sind die entsprechenden Proben vor sowie nach Rekonstitution zu sehen.

Nach Rekonstitution zeigte das UV/Vis-Spektrum ein Maximum bei 418 nm mit signifikant höherer Intensität als das Maximum bei 415 nm bei dem Protein vor Rekonstitution. Auch die Schulter bei etwa 315 nm besaß eine höhere Intensität als vor der Rekonstitution. Das Verhältnis von Eisen zu Protein wurde erneut bestimmt und hatte sich um etwa 100 % erhöht (Tabelle 29). Maximal besaß das MBP-TEV-MccC-Strep nach Tauen zwischen einem und zwei [4Fe4S]-Zentren pro Protein, nach der Rekonstitution hingegen drei [4Fe4S]-Zentren pro Protein. Insgesamt wurde die Rekonstitution von zusätzlichen [4Fe4S]-Zentren in MBP-TEV-MccC-Strep erfolgreich demonstriert.

Tabelle 29. Molares Verhältnis von Eisen zu Protein vor und nach Rekonstitution. „Frisch isoliert“ entspricht Protein direkt nach der Reinigung, „getaut“ nach Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für etwa 3 Wochen, „rekonstituiert“ nach Rekonstitution nach **Kap. 5.9.12** beschrieben. Die Standardabweichung des Verhältnisses entspricht der Standardabweichung der drei berechneten Eisen-zu-Protein-Verhältnisse aus den drei technischen Replikaten.

Probe	Protein [mg/mL]	Protein [$\mu\text{mol/L}$]	Fe [$\mu\text{mol/L}$]	Fe/Protein
frisch isoliert ¹	$2,1 \pm 0,1$	$32,5 \pm 1,8$	$267,3 \pm 10,0$	$8,3 \pm 0,5$
getaut	$2,4 \pm 0,1$	$36,8 \pm 1,3$	$186,3 \pm 8,2$	$5,1 \pm 0,2$
rekonstituiert	$3,8 \pm 0,1$	$58,9 \pm 1,9$	$737,0 \pm 8,0$	$12,5 \pm 0,6$

¹siehe auch Tabelle 28.

6.4.5. Diskussion

Die ermittelten Strukturmodelle von MccC und -D sind ein Strukturvorschlag und sollten nicht als akkurate Struktur des MccCD-Komplexes angesehen werden. Der Grund für die Erstellung dieser hypothetischen Strukturen war die Voraussage, ob bestimmte Aminosäure-Reste für die Elektronenübertragung wichtig sein könnten. Da die Chinon-Bindetaschen von MccD nach der von PscC modelliert worden war und letztere nach Energieminimierung durch I-Tasser eine vergleichbare Struktur beibehalten hatte, lag auch der Kofaktor MK7 nach Zusammenlegen der PscC- und MccD-Struktur in Pymol in der Chinon-Bindetasche von MccD. Während hydrophobe Aminosäure-Reste wie das konservierte M95 für die Bindung und Koordination der aromatischen Naphthochinol-Kopfgruppe zuständig sind, sind die drei Aminosäurereste W17, Y24 und Y161 möglicherweise im Elektronentransport sowie der Beibehaltung der Struktur der Chinon-Bindetasche involviert (Abbildung 30C). Die π -Orbitale aromatischer Aminosäurereste sind hypothetisch in der Lage, Elektronen zwischen Kofaktoren wie MK und einem [4Fe4S]-Zentrum (im Fall des Elektronentransportes von MccD zu MccC) oder zwischen zwei [4Fe4S]-Zentren (innerhalb von MccC) zu transportieren. Der Austausch des Phenylalanin-Restes 158 in MccC durch Leucin, als auch durch Tryptophan beeinträchtigte die Sulfitreduktionsfähigkeit von *W. succinogenes* signifikant. Eine Ursache für diese Beeinträchtigung kann sein, dass die Protein-Variante nicht stabil war und entweder vor der Interaktion mit MccD und MccA abgebaut wird, oder es trotz Vorhandensein im Periplasma aufgrund von Fehlfaltung nicht mit den anderen Mcc-Proteinen interagieren kann. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die F158-Varianten zwar ebenfalls eine native Faltung einnahmen, dass aber F158 für die Elektronenübertragung zwischen den beiden nächstgelegenen [4Fe4S]-Zentren notwendig ist. Die F158-Varianten würden in diesem Fall zwar wie das Wildstamm-Protein mit MccD und MccA interagieren, aber es würde aufgrund der fehlenden Elektronenübertragung zum Funktionsverlust kommen. Anhand der Experimente mit *W. succinogenes* allein kann keine definitive Aussage über die Stabilität der MccC-Varianten getroffen werden, da trotz vorhandener Sulfitatmung kein MccC nachgewiesen werden konnte. Allerdings war die Produktion, Detektion und Reinigung als MBP-Fusionsprotein in *E. coli* möglich. Alle MccC-F158-Varianten konnten produziert werden und die Eisen-Beladung zwischen den gereinigten Varianten und MBP-TEV-MccC-Strep war vergleichbar (Tabelle 28). Somit erschien es prinzipiell plausibel, dass der Austausch von F158 keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinstabilität unter den gegebenen Bedingungen hatte. Für eine Beurteilung der Stabilität muss allerdings auch in Betracht gezogen werden, dass das Maltosebindeprotein einen

stabilisierenden Effekt ausüben könnte. Die Fusion mit dem Maltosebindeprotein erhöht nicht nur die Löslichkeit des Proteins, die hydrophobe Maltose-Bindetasche kann auch mit dem Fusionspartner interagieren und somit als Chaperon für diesen wirken [65][66]. Die Fähigkeit, unlösliche Proteine für die Affinitäts-Reinigung zugänglich zu machen, wurde auch bei Multihäm-Cytochromen *c* der Hydroxylamin-Oxidoreduktase-Familie demonstriert und erlaubte eine deutlich erhöhte heterologe Produktion des funktionalen Enzyms [67]. Es ist somit möglich, sodass der Austausch von F158 das Protein zwar destabilisierte, dieser Effekt aber durch das Maltosebindeprotein kompensiert werden konnte. Vorangegangene Versuche, das MccC ohne Fusionspartner zu produzieren, resultierten entweder in apo-Protein, welches in Einschlusskörpern vorlag, oder es wurde kein Protein produziert (nicht gezeigt). Auch die Produktion zusammen mit ISC-Proteinen war ohne Vorhandensein des Fusionspartners MBP erfolglos. Weder durch gleichzeitige Produktion von ISC-Proteinen durch das Helferplasmid pCOLA Fe/S kan, noch durch ein dereguliertes ISC-Operon in der Mutante *E. coli* BL21 (DE3) Δ iscR::kan konnte [4Fe4S]-Zentren besitzendes MccC erhalten werden. Allerdings war auch mit MBP die Beladung mit [4Fe4S]-Zentren nicht vollständig. Es wäre möglich, dass das MBP durch seine Interaktion mit dem MccC die vollständige Beladung mit [4Fe4S]-Zentren verhindert. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass [4Fe4S]-Zentren, welche Sauerstoff oder anderen Oxidationsmittels ausgesetzt sind, zu [2Fe2S]-Zentren zerfallen, anstatt komplett zu degradieren, wie beispielsweise in IscU, FNR oder ^{Nif}IscA [68–70]. Daher kann allein aufgrund der Eisenbeladung nicht direkt auf das Vorhandensein von [4Fe4S]-Zentren geschlossen werden.

Während der Reinigung von MBP-TEV-MccC-Strep verblieb ein Teil des Proteins im Durchfluss. Die Durchführung der Reinigung nicht von den Angaben des Herstellers der MPB-Trap Säulen (GE Healthcare, Freiburg) abwich, sollte die Bindung des Maltosebindeproteins an die Säule optimal sein. Es ist allerdings möglich, dass während des Wachstums im Vollmedium TB Maltose von den wachsenden Zellen als Kohlenstoffquelle aufgenommen wurde [71]. Ein Teil der Maltose würde an das MBP-TEV-MccC-Strep binden und der Anteil von Fusionsprotein mit gebundenem MBP wäre nicht mehr in der Lage, mit der Säule zu assoziieren. Darüber hinaus kann durch Interaktion von MBP mit dem fusionierten MccC dessen Bindung an die Säule zusätzlich beeinträchtigt werden.

Während der Formiatdehydrogenase-abhängigen Sulfitatmung wird für die Formiat-Dehydrogenase ein Verhältnis der vom Cytoplasma in das Periplasma übertragenen Protonen zu durch die Formiat-Oxidation gewonnenen Elektronen von 1 vorausgesagt (Abbildung 4). Dies wurde für die Formiatdehydrogenase FdhABC durch vorherige Untersuchungen zum Elektronentransport in *W. succinogenes* beobachtet und wird daher auch bei der Atmung von

Sulfit angenommen [72–74]. Im Gegensatz hierzu wird die MccACD-abhängige Sulfitreduktion als elektroneutral angenommen. Wie in **Kap. 4.4** erläutert, beträgt die theoretisch maximal mögliche Zahl an vom Cytoplasma in das Periplasma übertragenen Protonen pro übertragenes Elektron etwa 2,11 (Formel (2)). Verglichen mit der erwarteten Übertragung von 1 Proton pro transportiertem Elektron aufgrund der elektrogenen Formiat-Oxidation entspräche dies einem Wirkungsgrad von nahezu 50 %. Verglichen hiermit besitzt die Formiat-Dehydrogenase abhängige Fumarat-Atmung (katalysiert durch FrdABC) ein theoretisches Verhältnis von übertragenen Protonen zu transportierten Elektronen von 3,1 (gegeben E_0' (Fumarat/Succinat) = +33 mV). Da nach heutigem Wissensstand Fumaratreduktion mit Menachinol elektroneutral ist [75][76], ergibt sich ein Wirkungsgrad von etwa 33 %. Für die Formiat-Dehydrogenase-abhängige Nitrat-Reduktion mit E_0' (NO₃⁻/NO₂⁻) = +433 mV läge der Wirkungsgrad bei 17 %. Dies macht die Formiat-Dehydrogenase-abhängige Sulfitreduktion zu einem vergleichsweise Energie-effizienten Prozess.

6.5. Das Kupferchaperon MccL

6.5.1. Produktion von MccL in *Wolinella succinogenes* und Mutagenese der Kupfer-Bindemotive

Zur Produktion und Reinigung von MccL in *W. succinogenes* wurde die Mutante *W. succinogenes* *mccR*⁺ *P*_{mcc} *mccL-1S* konstruiert. Der C-Terminus des Proteins wurde mit dem Streptag WSHPQFEK (S) fusioniert, zur besseren Zugänglichkeit dieses Affinitätspeptides wurden MccL und der Streptag durch das Peptid SASPQP (I) getrennt. Das resultierende Affinitätspeptid SASPQPWSHPQFEK wird im Folgenden als 1S abgekürzt. Stromaufwärts von *mccL* befand sich ein zweites *mcc*-Promotorelement, um die Menge an erhaltenem Transkript und so die Menge an produziertem Protein zu erhöhen. Diese Mutante wurde auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium angezogen und produziertes MccL-1S gereinigt (Abbildung 34). Die erwartete Masse des Proteins lag bei 39,0 kDa (prozessiert) oder 41,1 kDa (Protein inklusive Signalsequenz).

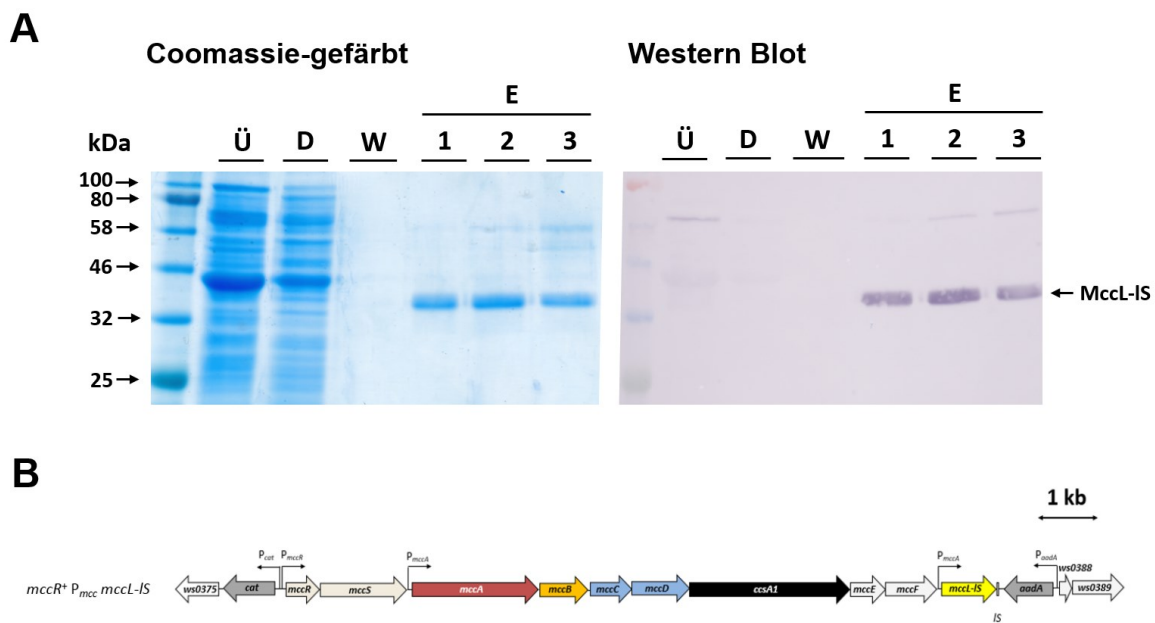


Abbildung 34. Produktion von MccL-1S in *W. succinogenes*. **A:** Nachweis von aus *W. succinogenes* *mccR*⁺ *P*_{mcc} *mccL-1S* gereinigtem MccL-1S. Fraktionen des Überstandes nach Zellaufschluss (Ü, 25 µg Protein), des Durchflusses der Streptactin-Säule (D, 25 µg Protein), 30 µL der letzten Waschfraktion (W) sowie 25 µL der drei Eluate mit der höchsten Proteinkonzentration (E1 bis E3, je etwa 10 µg Protein) wurden mittels SDS-PAGE getrennt. Anschließend wurden die Proteine zum einen mittels Coomassie gefärbt, zum anderen wurde MccL-1S mittels Streptag-spezifischem Antikörper nachgewiesen (**Kap. 5.9.4** und **5.9.5**). Als Proteinleiter diente die Color Prestained Protein Ladder P7712. **B:** Genkarte des *mcc*-Genclusters von *W. succinogenes* *mccR*⁺ *P*_{mcc} *mccL-1S*. Graue Linien unter den Leserahmen zeigen den Bereich der Rekombination mit dem passenden Plasmid (Abbildung 47 im Anhang).

MccL verfügt über zwei Sequenzmotive mit der konservierten Sequenz CXXCXM, für welches die Bindung von Cu(I) über die Cysteine sowie das Methionin vorhergesagt wurden [77–79]. In jeweils einem dieser Motive wurden die Schwefel-enhaltenden Reste durch aliphatische Aminosäuren ausgetauscht, was die Bindung an Cu(I) verhindert. Entsprechend war in der Mutante *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mccL_C42A_C45A_M47L-IS* (*W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mccL_N-IS*) das nahe des N-Terminus liegende und in *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mccL_C236A_C239A_M241L-IS* (*W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mccL_C-IS*) das nahe des C-Terminus liegende Motiv verändert.

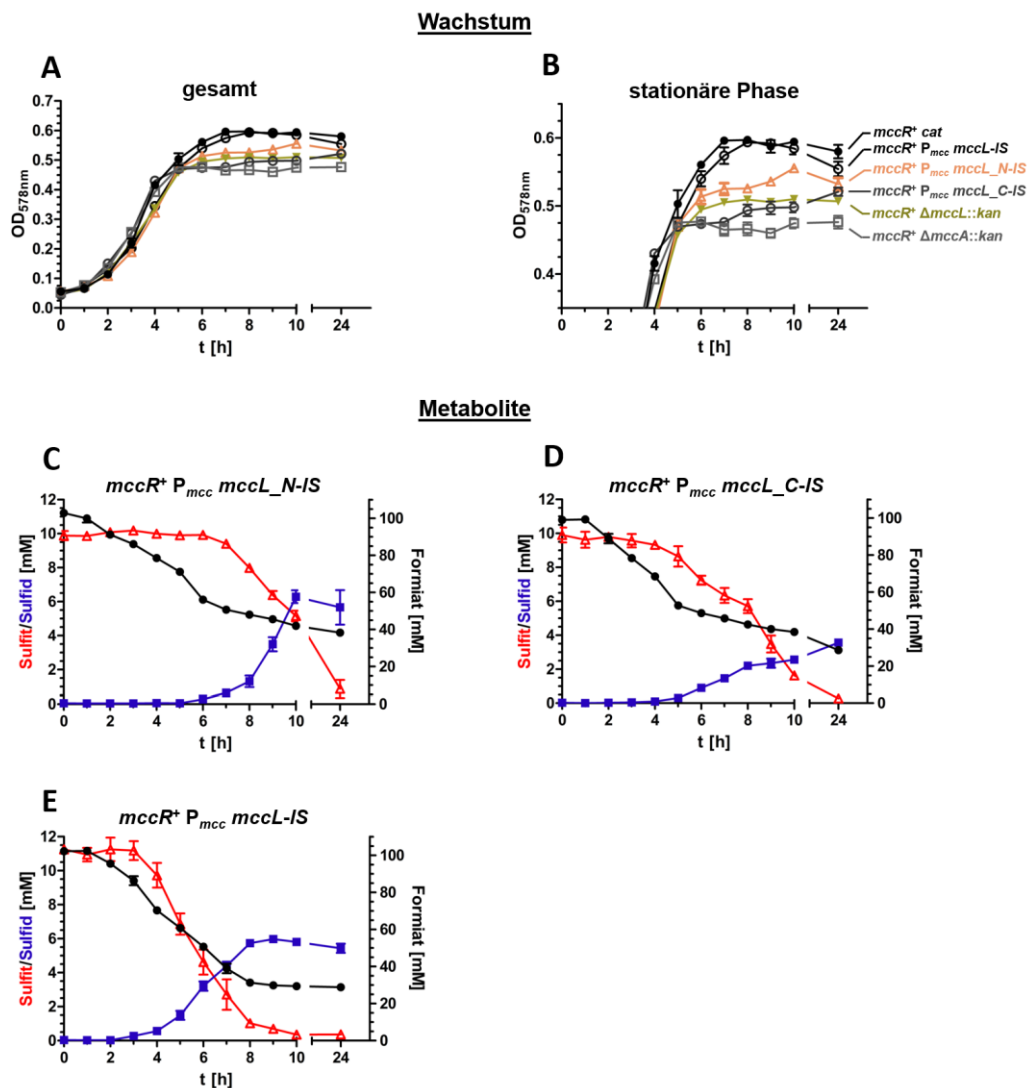


Abbildung 35. Charakterisierung der Sulfitatmung von *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mccL-IS*, der Mutanten der putativen Cu(I)-bindenden Motive. **A:** Wachstum der Mutanten *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mccL-IS*, *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mccL_N-IS*, *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mccL_C-IS* sowie ausgewählter Kontroll-Mutanten. **B:** Ausschnitt der Wachstumskurven von **A** bei Erreichen der stationären Phase. **C–E:** Metaboliten-Konzentrationen von *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mccL-IS* sowie der Mutanten der putativen Cu(I)-bindenden Motive. Für jede Kurve wurden 3 biologische Replikate eingesetzt.

Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mcl-1S* wuchsen auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium mit einer OD₅₇₈ von 0,593 ± 0,009 vergleichbar mit Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ cat* und die Umsatzraten von Formiat, Sulfit und die Produktion von Sulfid wichen zwischen 3 % und 8 % von denen der Parentalmutante ab (Tabelle 30). Kulturen der Mutante *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mcl-N-1S* wuchsen auf eine OD₅₇₈ von 0,551 ± 0,003, welche zwischen der OD₅₇₈ der Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ cat* (0,597 ± 0,012) und der von *W. succinogenes mccR⁺ Δmcl::kan* (0,511 ± 0,021) lag (Abbildung 35A, B, Tabelle 30). Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mcl-C-1S* allerdings wuchsen mit 0,521 ± 0,011 nicht signifikant höher als Kulturen der *W. succinogenes mccR⁺ mcl*-Deletionsmutante. Sowohl *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mcl-N-1S* als auch *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mcl-C-1S* atmeten während des Wachstums das vorhandene Sulfit ähnlich wie Kulturen der Mutante ohne *mcl* (Abbildung 35C, D, Abbildung 21H), obwohl alle diese Mutanten durch Sulfitexposition etwa gleiche Mengen an MccA und MccL produzierten (Abbildung 36). Die verminderte Fähigkeit zur Sulfitatmung spiegelte sich auch in der Umsatzraten der Zellsuspensionen der zuvor auf Formiat-Fumarat-Sulfit gewachsenen Kulturen wider, wobei die Umsatzraten von *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mcl-N-1S* zwischen 80 (Sulfit) und 86 % (Formiat) und jene von *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mcl-C-1S* zwischen 73 (Sulfit) und 78 % (Sulfid) derjenigen von *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mcl-1S* entsprachen (Tabelle 30). Der Austausch der schwefelhaltigen Aminosäuren sowohl des N-terminalen, als auch des C-terminalen putativen Cu(I)-Bindemotives hatte also einen negativen Einfluss auf die Fähigkeit der resultierenden Mutante, Sulfit zu atmen.

Tabelle 30. Charakterisierung des Wachstums sowie der Sulfitatmung von *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mcl-1S*, *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mcl-N-1S* sowie *W. succinogenes mccR⁺ P_{mcc} mcl-C-1S* auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium. Jeder Mittelwert und dessen Standardabweichung wurde mithilfe von 3 biologischen Replikaten bestimmt.

Stamm/Mutante	OD ₅₇₈ in der stationären Phase ¹	Verdopplungszeit [min] ¹	Verbrauchsrate	Verbrauchsrate	Produktionsrate
			Formiat	Sulfit	Sulfid
			[nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹]		
<i>mccR⁺ cat</i>	0,597 ± 0,012	63 ± 9	239 ± 20	68 ± 7	63 ± 4
<i>mccR⁺ P_{mcc} mcl-1S</i>	0,593 ± 0,009	71 ± 4	219 ± 18	70 ± 8	59 ± 4
<i>mccR⁺ P_{mcc} mcl-N-1S</i>	0,556 ± 0,003	78 ± 1	188 ± 28	56 ± 5	50 ± 4
<i>mccR⁺ P_{mcc} mcl-C-1S</i>	0,521 ± 0,011	74 ± 4	162 ± 26	51 ± 4	46 ± 3
<i>mccR⁺ Δmcl::kan</i>	0,511 ± 0,021	77 ± 9	155 ± 17	45 ± 6	35 ± 4

¹Die OD₅₇₈ nach 24 h Inkubation und die Verdopplungszeit wurden anhand der Werte, welche optische in den Wachstumskurven dargestellt sind, errechnet (siehe Formel (6) in Kap. 5.10.1).

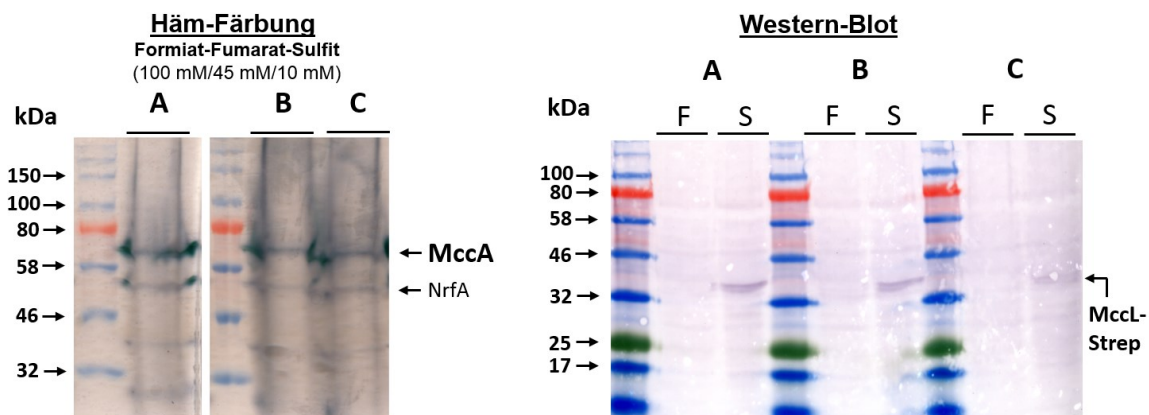
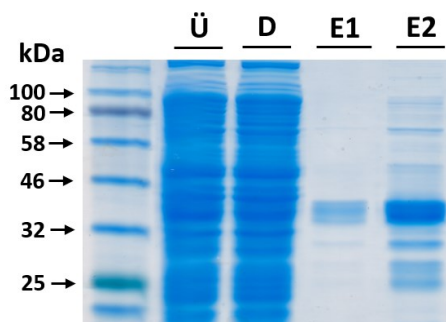


Abbildung 36. Nachweis von MccA und MccL in auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium wachsenden Kulturen der Mutanten *W. succinogenes* *mccR*⁺ *P*_{mcc} *mccL-LS* sowie der Mutanten mit veränderten putativen Cu(I)-Bindemotiven. Kulturen der Mutanten *W. succinogenes* *mccR*⁺ *P*_{mcc} *mccL-LS* (A), *W. succinogenes* *mccR*⁺ *P*_{mcc} *mccL_N-LS* (B) und *W. succinogenes* *mccR*⁺ *P*_{mcc} *mccL_C-LS* (C) wuchsen für 10 h auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium. 100 µg an Protein pro Spur wurden mittels SDS-PAGE in einem 12,5 % (w/v)-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend entweder Cytochrome *c* nach Kap. 3.8.3 (links) oder das affinitätsgetagte MccL-Protein detektiert (rechts). Für die Immunodetektion wurden von jeder Mutante Zell-Lysate von Kulturen, welche auf Formiat-Fumarat-Medium (F) oder auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium (S) gewachsen waren, aufgetrennt. Als Proteinleiter diente die Color Prestained Protein Ladder P7712.

6.5.2. Produktion von MccL in *Escherichia coli*

Alternativ wurde MccL heterolog in *E. coli* produziert. Es wurde die CodonPlus-Mutante von *E. coli* BL21 (DE3) gewählt, um die Beeinträchtigung der Expression von *mccL* aufgrund von in *E. coli* seltenen Codons zu verhindern. Da Gen *mccL* wurde ohne die 57 bp am 5'-Ende, welche für die Signalsequenz von MccL kodieren, in das Plasmid pASK2 ligiert, wo das Protein stattdessen mit der Signalsequenz des *E. coli* OmpA produziert wurde. Zur Reinigung besaß es wie das in *Wolinella* überproduzierte Protein das C-terminale modifizierte Streptag-Peptid (MccL-IS; vergleiche mit Kap. 6.5.1). Für apo-MccL-IS wurde eine Masse von 39,0 kDa (prozessiert) und von 40,4 kDa (mit der *E. coli* OmpA-Signalsequenz) vorausgesagt. Im mit Coomassie gefärbten Eluat und mittels Immunodetektion wurden zwei Peptide mit entsprechender Masse nachgewiesen, bei welchem es sich vermutlich um das prozessierte und das unprozessierte MccL handelt (Abbildung 37). Darüber hinaus wurden weitere Peptide, bei welchen es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte von MccL handelt, mittels Immunodetektion nachgewiesen. Immunologisch ließen sich im Durchfluss der Säule sowohl die beiden Fraktionen mit dem für MccL erwarteten Massen als auch Peptide geringerer Größe nachweisen. Somit band nur ein Teil des produzierten Proteins an die Säule.

Coomassie-gefärbt



Western Blot

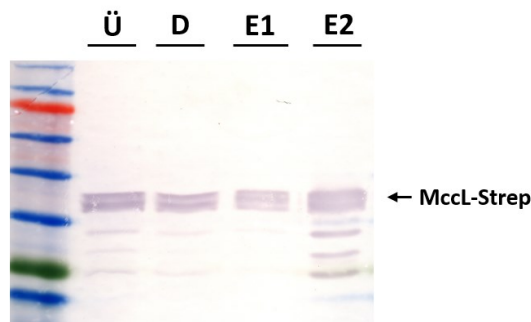


Abbildung 37. Nachweis von gereinigtem MccL-Strep. 40 μg des Überstandes (Ü), 40 μg des Durchflusses der Säule (D) sowie 5 μg (E1) oder 20 μg (E2) des Eluates wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde zum einen eine Coomassie-Färbung durchgeführt, zum anderen das Protein immunologisch nachgewiesen. Als Proteinleiter diente die Color Prestained Protein Ladder P7712.

6.5.3. Kupferbeladung von MccL

Um die Rolle von MccL als Kupferchaperon zu demonstrieren, wurde Kupfer in gereinigtem MccL-IS aus *W. succinogenes* und *E. coli* mittels 2,2'-Bichinolin unter denaturierenden Bedingungen quantifiziert (Kap. 5.9.13; Tabelle 31). Es wurde hierbei stets frisch anaerob gereinigtes MccL verwendet, um Verlust von Cu(I) zum einen durch das Einfrieren und anschließende Tauen, zum anderen durch die Sauerstoff-Oxidation zu vermeiden.

Der Gehalt von MccL-IS aus *W. succinogenes* betrug etwa 0,21 mol Kupfer pro mol Protein, der Gehalt des aus *E. coli* gereinigten Proteins 0,18 mol Kupfer pro mol Protein (Tabelle 31). Dies entsprach keinem stöchiometrischen Verhältnis von Kupfer zu Protein.

Aufgrund des geringen Kupfergehaltes wurde mittels DTT reduziertes MccL-IS mit TACH in einem Puffer mit 10 % (w/v) Acetonitril rekonstituiert (Kap. 5.9.14). Nach Addition des Cu(I)-Salzes färbte sich der MccL-IS-enthaltende Ansatz gelb-grünlich, was in der Kontrolle ohne Protein nicht beobachtet wurde (Abbildung 38). Während und nach der Dialyse mit dem Rekonstitutionspuffer ohne Acetonitril wurde das Protein allerdings instabil und präzipitierte innerhalb weniger Stunden auf Eis. Es war dennoch möglich, die Kupferkonzentration des dialysierten Ansatzes und somit das Verhältnis von Kupfer zu Protein zu bestimmen. Der Kupfergehalt konnte nach Rekonstitution signifikant gesteigert werden und lag bei 1,21 Kupferatom pro MccL (Tabelle 31). Dies würde für die Bindung von einem Cu(I) pro MccL-Monomer sprechen.

Tabelle 31: Kupfergehalt von anaerob aus dem Organismus *W. succinogenes* *mccR*⁺ *P_{mcc} mccl-1S* oder aus *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus pASK2 *mccl-1S* gereinigtem Mccl-1S. Proteinkonzentrationen wurden nach **Kap. 5.8.8** (Bradford), die Kupferkonzentration nach **Kap. 5.9.13** bestimmt. Unten gelistet ist der Kupfergehalt von aus *W. succinogenes* gereinigtem Mccl nach Rekonstitution mit TACH. Die Standardabweichung des Verhältnisses entspricht der Standardabweichung der drei Kupfer-zu-Protein-Verhältnisse aus drei technischen Replikaten.

Organismus	Protein [$\mu\text{mol/L}$]	Cu [$\mu\text{mol/L}$]	Cu/Protein
<i>W. succinogenes</i>	$17,7 \pm 0,6$	$3,7 \pm 0,3$	$0,21 \pm 0,02$
<i>E. coli</i>	$22,8 \pm 0,9$	$4,2 \pm 0,2$	$0,18 \pm 0,03$
Nach Rekonstitution			
<i>W. succinogenes</i>	$19,7 \pm 1,9$	$23,4 \pm 0,5$	$1,21 \pm 0,10$

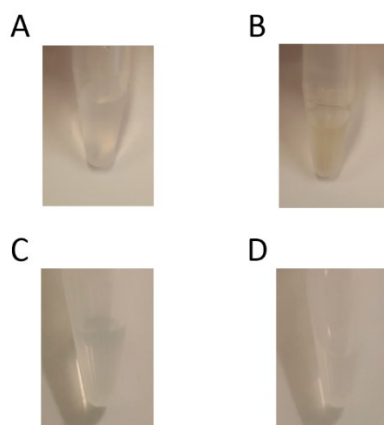


Abbildung 38. Rekonstitution von aus *W. succinogenes* aufgereinigtem Mccl mit TACH nach **Kap. 3.8.14**. **A:** Ansatz mit Elutionspuffer und Mccl-1S vor Pufferwechsel für die Rekonstitution. **B:** Ansatz mit Mccl nach Rekonstitution mit TACH in Rekonstitutionspuffer ohne Acetonitril. **C:** Elutionspuffer ohne Mccl-1S. **D:** Ansatz ohne Protein nach Rekonstitution mit TACH in Rekonstitutionspuffer ohne Acetonitril.

6.5.4. Diskussion

MccL stellt ein einzigartiges Chaperon der NosL-Superfamilie dar, da es pro Protein zwei CXXCXM-Bindemotive besitzt. Von den bisher bekannten 161 Isolaten, deren Genom ein Homolog des *Wolinella succinogenes* MccL kodieren, werden 151 zu den Epsilonproteobakterien gezählt. Die 10 homologen Gene der Isolate außerhalb der Epsilonproteobakterien befinden sich nicht in einer zwischen den Isolaten konservierten Gen-Anordnung i.e. sie scheinen nicht in Operons kodiert zu sein, sondern liegen isoliert vor. Die Gene der epsilonproteobakteriellen Orthologe wurden entweder isoliert oder in *mcc*-Genclustern gefunden (vergleiche mit **Kap. 6.7.2**). Wie bereits in der Einleitung erläutert, müssen Kupferchaperone das Cu(I) mit hoher Affinität binden, um Biomoleküle vor dessen Toxizität zu schützen. Je nach Protein oder Umgebungsbedingungen scheinen unterschiedliche Stöchiometrien zwischen Kupferchaperon und gebundenem Metall zu existieren, welche in manchen Fällen die Zahl der Kupferbindemotive übersteigen kann. Für das *Homo sapiens* Atox1 (MXCXXC) wurden Dimere mit einem Cu(I) oder solche mit zwei Cu(I) pro Dimer beschrieben [79], *Bacillus subtilis* CopZ (MXCXXC) wurde als Dimer mit 4 oder Trimer mit 3 Cu(I)-Atomen kristallisiert [80][81] und das Atx1 von *Synechocystis* sp. PCC6803 (CXXC) existiert als Dimer mit je zwei oder vier gebundenen Cu(I)-Atomen [82]. Allen gemein ist, dass mehrere Untereinheiten Cu(I) in einem multinuklearen Zentrum binden. Für MccL wird hypothetisch angenommen, dass ein mononukleares oder multinukleares Cu(I)-Zentrum von einem Monomer stabilisiert werden kann. Für die Beladung von MccL könnte so der Kontakt des Chaperons mit dem Cu(I)-liefernden Protein genügen. Bei Cu(I)-Lieferung an ein Dimer ist die Bildung des Dimers ein entscheidender Schritt, welcher im ungünstigsten Fall (gleichmäßige Verteilung im Cytoplasma) vom Quadrat der Konzentration des Monomers abhängt.

Somit würde sich für die Reaktion $2 \text{ Cu(I)} + 2 \text{ Kupferchaperone} \rightarrow [\text{Kupferchaperon-Cu(I)}]^2$ folgendes Verhältnis zwischen Reaktionskinetik und Konzentration der beteiligten Reaktanden einstellen:

$$v_1 = [\text{Cu(I)}]^2 * [\text{Kupferchaperon}]^2 \quad (7)$$

v_1 entspricht der Rate der Bindung zwischen Cu(I) und dem Kupferchaperon mit einem Kupferbindemotiv, $[\text{Cu(I)}]$ der Konzentration des für die Chaperon-Bindung verfügbaren Cu(I), $[\text{Kupferchaperon}]$ entspricht der Konzentration des für die Cu-Bindung verfügbaren Kupferchaperons

Sofern MccL für die Cu(I)-Lieferung an MccA nicht dimerisieren müsste, wäre die Lieferung von Cu(I) an MccA nicht vom Quadrat der MccL-Konzentration, sondern nur von der MccL-Konzentration abhängig, was wesentlich effizienter wäre.

$$v_2 = [Cu^+]^2 * [Kupferchaperon] \quad (8)$$

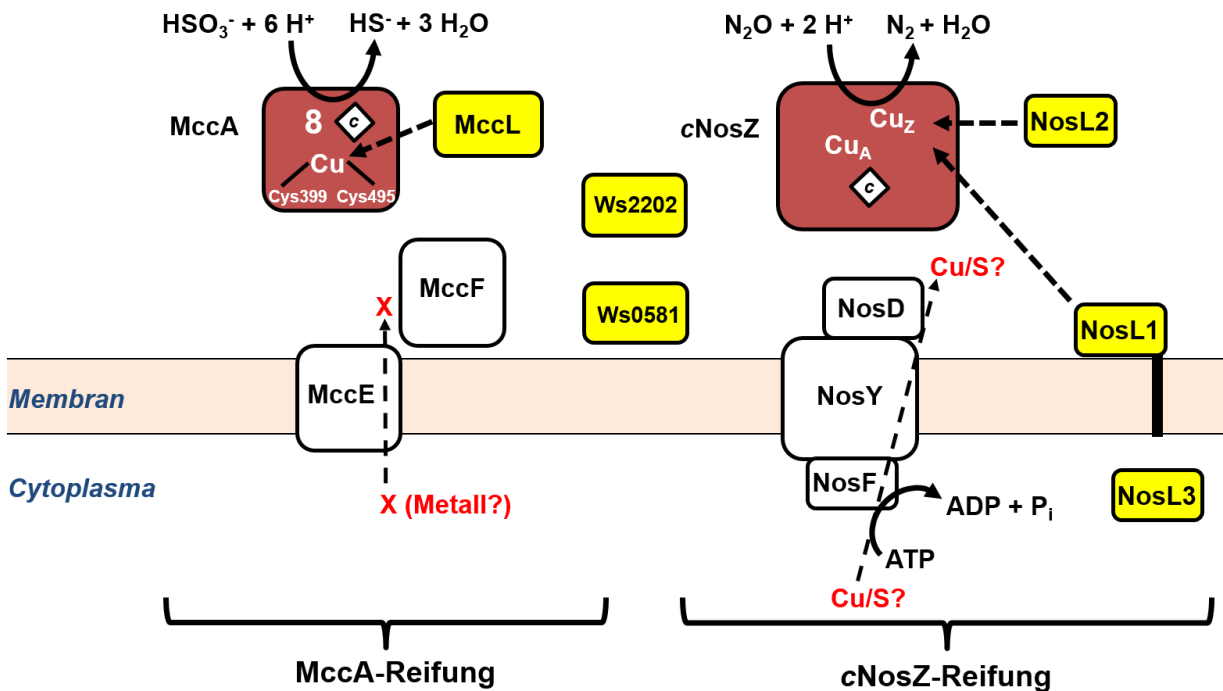
Hier ist v_2 die Rate der Bindung zwischen Cu(I) und dem Kupferchaperon mit zwei Bindemotiven.

Aus Formel (7) und (8) folgt bei gleicher Konzentration $[Kupferchaperon]$, dass $v_1 < v_2$.

Die Elektronentransportaktivitäten der Zellsuspensionen von *W. succinogenes* $mccR^+ P_{mcc} mccL_N$ -IS und *W. succinogenes* $mccR^+ P_{mcc} mccL_C$ -IS waren beide mit denen von *W. succinogenes* $mccR^+ \Delta mccL::kan$ vergleichbar. Dies spricht dafür, dass die Mutation jedes der beiden Cu(I)-Bindemotive die Funktion von MccL komplett unterbindet. Beide Cu(I)-Bindemotive scheinen für die Funktion von MccL notwendig zu sein, was für die Involvierung beider Bindezentren in der Bindung von Cu(I) spricht. MccL konnte *in vitro* mit mehr als einem Cu(I) pro Protein beladen werden (Tabelle 31), somit ist es auch möglich, dass ein multinukleares Cu(I)-Zentrum von einem Protein gebunden wird. Ohne aktives MccL, welches MccA beladen kann, wäre neben der abiotischen Cu(I)-Bindung auch die Involvierung anderer periplasmatischer Kupferchaperone möglich (Übersicht in Abbildung 39).

Abbildung 39. Modell zur Veranschaulichung der Kupferchaperone von *W. succinogenes* sowie von MccE und -F als potenzielle Cu(I)-Transport-Proteine. MccA (nativ als Trimer) und cNosZ (nativ als Dimer) sind der Einfachheit halber in monomerer Form dargestellt. Die Rolle von Ws0581 und Ws2202 in Bezug

Periplasma



auf die Beladung von MccA oder cNosZ ist unklar. NosL3 wurde als im Cytoplasma lokalisiert vorausgesagt, NosL1 liegt hypothetisch über einen prenylierten N-terminalen Cystein-Rest mit der Membran assoziiert vor. Unterbrochene Pfeile zeigen die hypothetische Lieferung von Cu, Schwefel oder anderen Metallen an. Nach [28].

Wolinella succinogenes besitzt 6 hypothetische periplasmatische Kupferchaperone [28]. Neben MccL und den auf dem *nos*-Gencluster kodierten Kupferchaperonen könnte die Belieferung von

MccA auch von den Ws0581 (CAE09713.1) und Ws2202 (CAE11192.1) übernommen werden. Ws2202 wurde ursprünglich als 282 Aminosäuren langes cytoplasmatisches Kupferchaperon mit einer nicht-annotierten N-terminalen Domäne und einer C-terminalen NosL-Domäne annotiert, allerdings ergibt sich bei Verschiebung des Startcodons zu Basenpaar 136 ein Leserahmen von 237 Aminosäuren, von welchen die N-terminalen 17 Aminosäure-Reste als Sec-Exportsequenz erkannt würden. Daher wird davon ausgegangen, dass die bisherige Annotation nicht korrekt ist. Diese scheinen nicht in Genclustern kodiert zu sein und könnten konstitutiv produziert werden. Die Rolle dieser Proteine ist bisher nicht bekannt, es wäre möglich, dass die Hauptaufgabe eines oder beide dieser Proteine vor allem in der Speicherung des Cu(I) und weniger in der Beladung anderer Proteine liegt. Es kann dabei aber nicht ausgeschlossen werden, dass eines oder beide potenzielle Kupferchaperone sowohl die Speicherung als auch den Transport von Kupfer zu anderen Proteinen übernehmen können und somit spezifische Kupferchaperone wie MccL unterstützen. Wie in **Kap. 6.2.2** beschrieben, könnten auch MccE und -F in die Reifung von MccA involviert sein. Diese könnten mit MccL einen funktionellen Komplex bilden, welcher Cu(I) an das Kupferchaperon abgibt. Bei Abwesenheit dieses Komplexes könnten nun Ws2202 oder Ws0581 dessen Rolle übernehmen.

6.6. Die Rolle von 8-Methylmenachinon für die Sulfitatmung

6.6.1. Anteil von 8-Methylmenachinon im Menachinonpool in Abhängigkeit vom Elektronenakzeptor

Wie in der Einleitung erläutert, besitzt *W. succinogenes* neben MK auch 8-MMK, wobei letzteres aufgrund des negativeren Redoxpotentials des 8-MMK/8-MMKH₂-Paares unter Standardbedingungen energetisch günstiger für die Reduktion von Sulfit zu Sulfid wäre [24][25]. Da die Synthese von 8-MMK aus MK die Aktivität eines zusätzlichen Enzyms (MqnK) erfordert, wäre es denkbar, dass die Produktion von 8-MMK und somit dessen Anteil verglichen mit MK abhängig vom Elektronenakzeptor ist, i.e. dass der Anteil an 8-MMK im Menachinonpool bei Elektronenakzeptoren mit positiverem Redoxpotential niedriger ausfällt als bei Elektronenakzeptoren mit negativerem Redoxpotential. Daher wurden der *W. succinogenes* Wildstamm, *W. succinogenes mccR⁺ cat* und der Stamm *W. succinogenes nosZ⁺* (ist im Gegensatz zum Wildstamm aufgrund des intakten *nosZ*-Gens in der Lage, N₂O zu atmen) mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren vermehrt und die Anteile von MK und 8-MMK quantifiziert (in Zusammenarbeit mit Sascha Hein, TU Darmstadt, **Kap. 5.10.6**) (Tabelle 32). Stand nur Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor zur Verfügung, so lag der Anteil des 8-MMK zwischen 64 % (Wildstamm) und 43 % (*W. succinogenes nosZ⁺*). Bei Wachstum in Formiat-Fumarat-Sulfit- oder Formiat-Sulfit-Medium veränderte sich der Anteil nicht signifikant, sondern betrug zwischen 44 % (*W. succinogenes nosZ⁺*) und 56 % (*W. succinogenes mccR⁺ cat*). Stand für *W. succinogenes nosZ⁺* stattdessen als Elektronenakzeptor Nitrat zur Verfügung, sank der Anteil von 8-MMK auf 12 %, unabhängig davon, ob das Medium mit 5 mM Fumarat oder 5 mM Succinat supplementiert wurde. Unter N₂O-Atmung betrug der Anteil von 8-MMK 15 % (5 mM Fumarat im Medium) oder verschwand mit 2 % nahezu vollständig (5 mM Succinat).

Tabelle 32. Anteile von MK und 8-MMK in *W. succinogenes* abhängig vom Stamm bzw. Mutante und Elektronenakzeptor. Chinone wurden nach Kap. 5.10.6 extrahiert und deren Anteile bestimmt.

Stamm/Mutante	terminaler Elektronenakzeptor	MK [%]	8-MMK [%]
Wildstamm	Fumarat (45 mM)	36	64
<i>mccR⁺ cat</i>	Fumarat (45 mM)	47	53
<i>nosZ⁺</i>	Fumarat (45 mM)	57	43
Wildstamm	Fumarat (45 mM), Sulfit (10 mM)	46	54
<i>mccR⁺ cat</i>	Fumarat (45 mM), Sulfit (10 mM)	44	56
<i>mccR⁺ cat</i> <i>ΔmqnK::kan</i>	Fumarat (45 mM), Sulfit (10 mM)	100	0
<i>nosZ⁺</i>	Fumarat (45 mM), Sulfit (10 mM)	56	44
<i>mccR⁺ cat</i>	Fumarat (5 mM), Sulfit (10 mM)	53	47
<i>mccR⁺ cat</i>	Sulfit (10 mM) ¹	54	46
<i>nosZ⁺</i>	N ₂ O, Fumarat (5 mM)	85	15
<i>nosZ⁺</i>	N ₂ O ¹	98	2
<i>nosZ⁺</i>	Nitrat (50 mM), Fumarat (5 mM)	88	12
<i>nosZ⁺</i>	Nitrat (50 mM) ¹	88	12

¹als Kohlenstoffquelle dienten 5 mM Succinat

6.6.2. Sulfitatmung bei Fehlen von 8-Methylmenachinon

Für die Produktion von 8-MMK ist das Gen *mqnK* in *W. succinogenes* unerlässlich [23]. Wie erwartet, war auch die Deletions-Mutante *W. succinogenes mccR⁺ ΔmqnK::kan* nicht mehr in der Lage, 8-MMK zu synthetisieren [23]. Kulturen dieser Mutante wuchsen in Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium nicht auf dieselbe OD₅₇₈ wie Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ cat*, aber höher als solche von *W. succinogenes ΔmccA::kan* (Abbildung 40A+B, Tabelle 33). Einhergehend hiermit waren Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ ΔmqnK::kan* in der Lage, Sulfit im Medium über 24 h Inkubation umzusetzen (Abbildung 40D) und produzierten mittels Häm-Färbung nachweisbares MccA (Abbildung 41). Im Gegensatz zu Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ cat* reduzierten Kulturen der *mqnK*-Deletionsmutante das vorhandene Sulfit allerdings signifikant langsamer, sodass nach 10 h Inkubation noch Sulfit im Medium vorhanden war. Die Umsatzraten der Zellsuspensionen von *W. succinogenes mccR⁺ ΔmqnK::kan* betragen 41 % (Sulfid) bis 49 % (Formiat) der von *W. succinogenes mccR⁺ cat* (Tabelle 33). Kulturen von *W. succinogenes mccR⁺ ΔmqnK::kan* wuchsen auch in Formiat-Sulfit-Medium. Analog zum

Wachstum in Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium wuchsen die Kulturen aber nicht so hoch wie solche von *W. succinogenes mccR⁺ cat* auf ebendiesem Medium (Abbildung 40C).

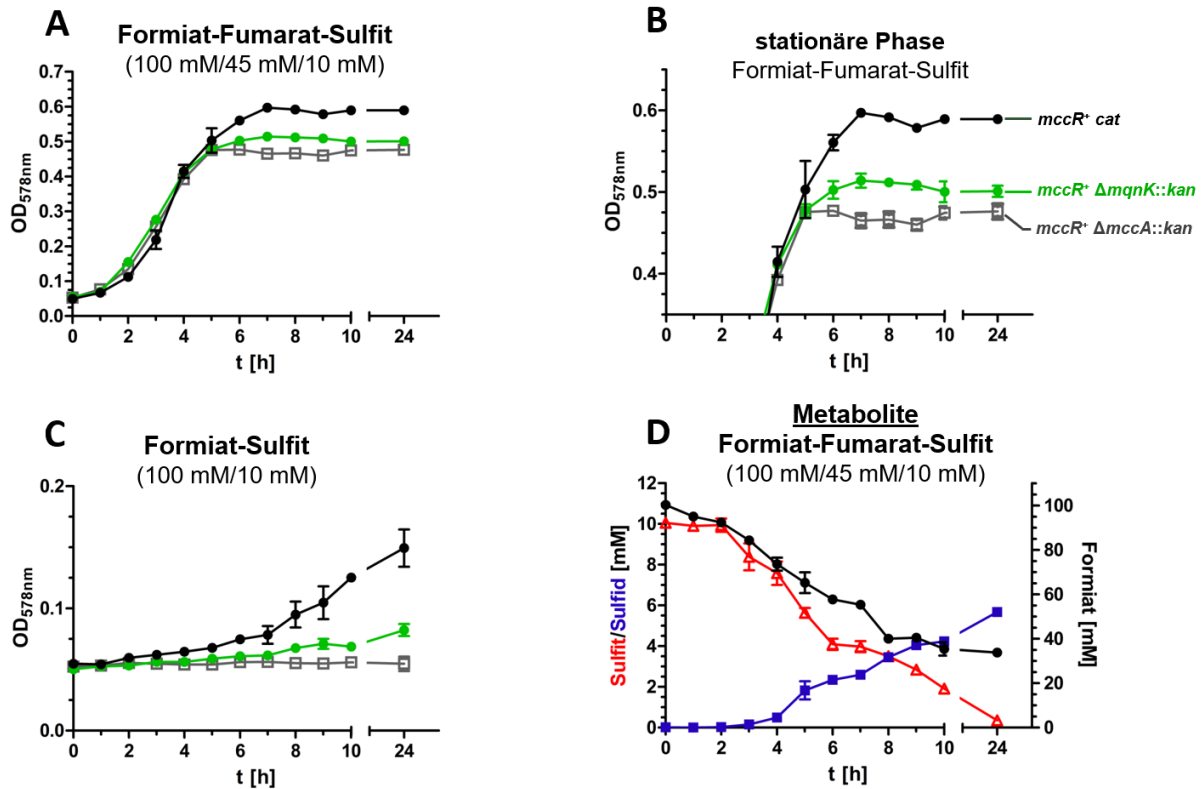


Abbildung 40. Charakterisierung der Sulfitatmung von *W. succinogenes mccR⁺ ΔmqnK::kan*. Kulturen wurden auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium oder auf Formiat-Sulfit-Medium vermehrt.

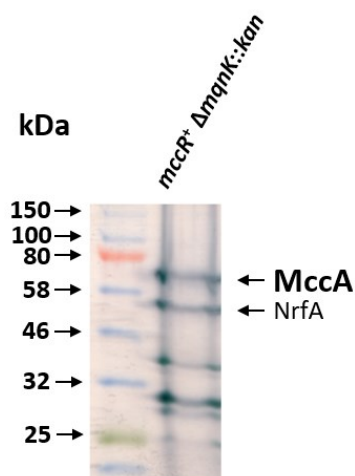


Abbildung 41. Nachweis von MccA in Zellen der Mutante *W. succinogenes mccR⁺ ΔmqnK::kan*. Zellen wurden auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium vermehrt und nach 24 h geerntet. 100 μ g Protein des Zell-Lysats wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend wurden die Cytochrome *c* mittels Häm-Färbung detektiert. Als Proteinleiter diente die Color Prestained Protein Ladder P7712.

Tabelle 33. Charakterisierung des Wachstums und der Sulfitatmung von *W. succinogenes* *mccR*⁺ Δ *mqnK::kan* und Vergleich mit *W. succinogenes* *mccR*⁺ *cat* sowie *W. succinogenes* *mccR*⁺ Δ *mccA::kan*. Erreichte OD₅₇₈, Verdopplungszeiten sowie Sulfit- und Formiat-Verbrauch und Sulfid-Produktion von Zellsuspensionen in der frühen stationären Phase sind aufgelistet. Jeder Mittelwert und dessen Standardabweichung wurde mithilfe von 3 biologischen Replikaten bestimmt.

Mutante	OD ₅₇₈ in der stationären Phase ¹	Verdopplungszeit [min] ¹	Verbrauchsrate	Verbrauchsrate	Produktionsrate
			Formiat ²	Sulfit ²	Sulfid ²
[nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹]					
Formiat-Fumarat-Sulfit (100 mM/45 mM/10 mM)					
<i>mccR</i> ⁺ <i>cat</i>	0,597 ± 0,012	63 ± 9	239 ± 20	68 ± 7	63 ± 4
<i>mccR</i> ⁺ <i>mqnK::kan</i>	0,514 ± 0,010	72 ± 2	118 ± 8	33 ± 1	26 ± 2
<i>mccR</i> ⁺ Δ <i>mccA::kan</i>	0,476 ± 0,016	73 ± 18	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Formiat-Sulfit (100 mM/10 mM)					
<i>mccR</i> ⁺ <i>cat</i>	0,149 ± 0,013	216 ± 59	187 ± 14	63 ± 5	51 ± 4
<i>mccR</i> ⁺ <i>mqnK::kan</i>	0,082 ± 0,008	447 ± 112	111 ± 7	32 ± 2	28 ± 3
<i>mccR</i> ⁺ Δ <i>mccA::kan</i>	0,056 ± 0,004	∞	n.b. ²	n.b. ²	n.b. ²

¹Die OD₅₇₈ nach 24 h Inkubation und die Verdopplungszeit wurden anhand der Werte, welche optische in den Wachstumskurven dargestellt sind, errechnet (siehe Formel (6) in **Kap. 5.10.1**) ²nicht bestimmbar, da kein Wachstum

6.6.3. Diskussion

Hypothetisch ist 8-MMK verglichen mit MK ein geeigneteres Molekül für den Elektronentransport zwischen dem Formiat-Dehydrogenasekomplex und dem Mcc-System, da das Redoxpotential des 8-MMK/8-MMKH₂-Paares zwischen dem des Sulfit/Sulfid- und dem des CO₂/Formiat-Paares liegt. Für den Elektronentransport zwischen dem Formiatdehydrogenase- und dem Mcc-Komplex hingegen genügte offenbar MK, wobei die Elektronentransportrate aber mit 41 % bis 49 % deutlich eingeschränkt war. Trotz der Begünstigung der Sulfitatmung durch 8-MMK und dessen Notwendigkeit bei der Polysulfidatmung lag 8-MMK in *W. succinogenes* während der Sulfit- (bzw. Sulfit-Fumarat-Atmung) oder Polysulfidatmung verglichen mit Fumarat-Atmung nicht in erhöhter Menge vor. Dies ist insofern erstaunlich, da *W. succinogenes* in der Lage ist, bei Elektronenakzeptoren mit negativerem Redoxpotential des Redoxpaares die Produktion an 8-MMK zu erhöhen [28].

W. succinogenes kann auch Polysulfid als Elektronenakzeptor nutzen, wobei das Redoxpotential des Polysulfid-/Sulfid-Paares mit etwa -275 mV um 200 mV niedriger ist als das des MK/MKH₂-Paares [83]. Der Elektronentransport zwischen der Polysulfid-Reduktase und Hydrogenase oder Formiat-Dehydrogenase war in Proteoliposomen abhängig von der Supplementation von 8-MMK, was die Notwendigkeit von 8-MMK für die Nutzung von Polysulfid als Elektronenakzeptor *in vitro* demonstrierte [21].

Die Spezifität von MccD für MK oder 8-MMK nicht bekannt. Offensichtlich ist MccD auch ohne 8-MMK aktiv. Bei einer Mischung aus MK und 8-MMK aber erlaubt es eine höhere Elektronentransportrate. Daher ist es plausibel, dass MccD beide Substrate binden und oxidieren kann. Alternativ könnte MK in der Bindetasche vorliegen und während des Elektronentransportes Elektronen von einem weiteren Molekül MK oder 8-MMK auf MccD übertragen.

6.7. Phylogenetische Analysen

6.7.1. Phylogenetische Einordnung der MccA-Homologe

Um das Verwandtschaftsverhältnis der MccA-Homologe zu beleuchten, wurden diese miteinander verglichen und dessen phylogenetischer Abstand durch einen Baum dargestellt (Abbildung 42). Im Folgenden sei deutlich gemacht, dass jede in der NCBI-Datenbank identifizierte MccA-Sequenz bzw. dessen Gen nicht nur einem Stamm, sondern auch je nach der Herkunft der genetischen Probe einem Isolat zugeordnet wird. Da die Genome von zwei Isolaten, auch wenn sie zum selben Stamm gehören, in der NCBI-Datenbank nicht genetisch identisch sein müssen, wurden MccA-Homologe hier und vor allem im nächsten Kapitel **Kap. 6.7.2** nicht Stämmen, sondern Isolaten zugeordnet. Als Homologie-Kriterium für die MccA-Sequenzen diente eine Übereinstimmung von mindestens 25 % der Aminosäuren (25 % Sequenzidentität) zwischen der Sequenz und dem *W. succinogenes* MccA (CAE09526.1) sowie zusätzlich das Vorhandensein von 7 CXXCH- und einem CX_{15/17}CH-Motiv (**Kap. 5.11.2**). Für die Ermittlung der Sequenzidentität sowie der phylogenetischen Abstände im Baum wurden die MccA-Sequenzen um das N-terminales Signalpeptid für den Sec-Export trunziert. Die Sequenzlängen variierten zwischen 622 Aminosäuren für das MccA-Homolog von *Edwardsiella tarda* NCTC10396 (STD50666.1) und 688 Resten für das Homolog aus *Shewanella* sp. Shew256 (WP_088211860.1), was als ähnlich genug für den Vergleich angesehen wurde.

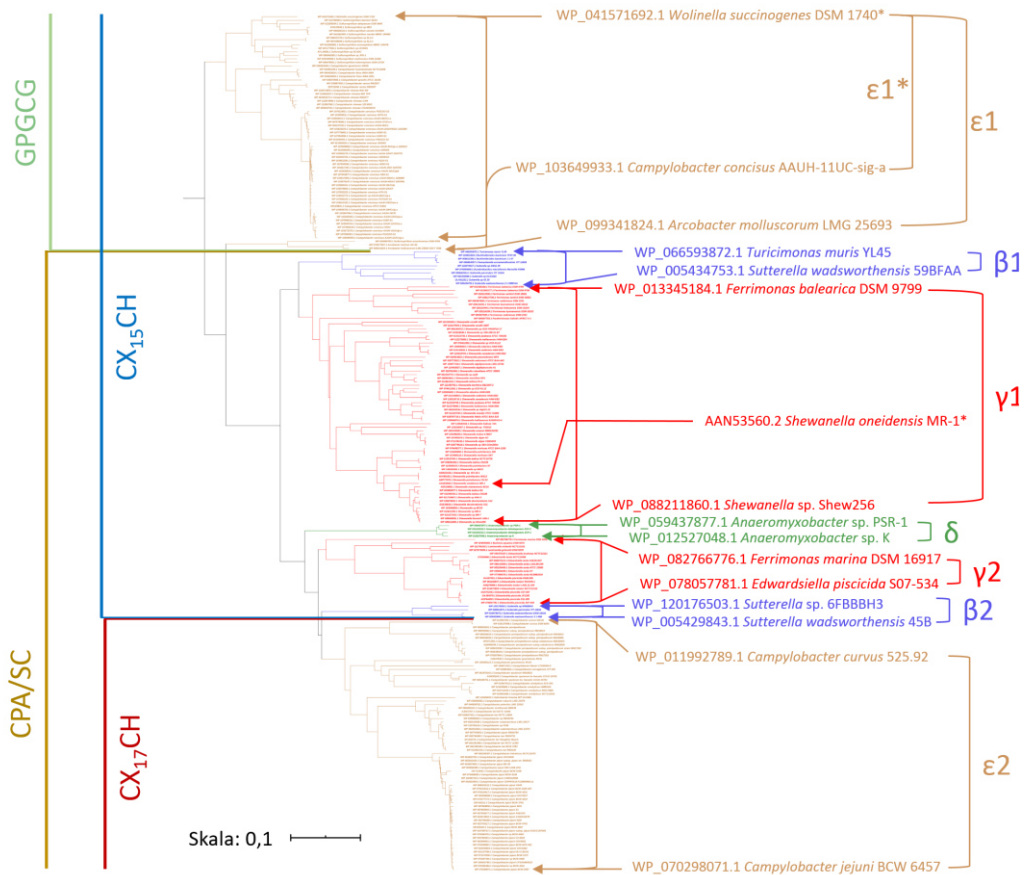


Abbildung 42. Phylogenetischer Baum der MccA-Homologe. Daten wurden nach **Kap. 5.11.2** ausgewertet und visualisiert. Die phylogenetischen Gruppen wurden farblich wie folgt angezeigt: rot: Gammaproteobakterien (γ), braun: Epsilonproteobakterien (ϵ), blau: Betaproteobakterien (β), grün: Deltaproteobakterien (δ). Gruppen wurden gegebenenfalls rechts nummeriert. Links wurden graphisch die Sequenzen mit einem CX₁₇CH-Motiv von solchen mit einem CX₁₅CH-Motiv voneinander getrennt. Außerdem wurden die Sequenzen, deren Äquivalent zu C399 im *W. succinogenes*-MccA Teil eines GPGCG-Motives von denen, welche an dessen Stelle über ein CPA/SC-Motiv verfügen, getrennt. Hervorgehoben wurden repräsentative Sequenzen zur Bestimmung der Sequenzähnlichkeit innerhalb der Gruppen.

Im phylogenetischen Baum lagen die MccA-Sequenzen in distinkten Gruppen vor. In jeder dieser Gruppen befinden sich ausschließlich Sequenzen nur einer Bakterienklasse. Im Gegensatz dazu existierten für jede Bakterienklasse mit Ausnahme der Deltaproteobakterien zwei Gruppen (entsprechend in Abbildung 42 nummeriert). Innerhalb dieser konnten Untergruppen voneinander unterschieden werden. Abgesehen von der Sequenz mit der Nummer WP_024954783.1 von *Sulfurospirillum archachonense* DSM 9755, welche in einer Untergruppe mit MccAs der Gattung *Arcobacter* lag, gruppierten sich die Sequenzen den bakteriellen Gattungen nach. Darüber hinaus wurde die Sequenzidentität zweier repräsentative Mitglieder jeder identifizierten Gruppe bestimmt (Tabelle 34). Die Sequenzidentität der beiden repräsentativen Sequenzen der Gruppe γ 2 waren am niedrigsten, mit 55,9 % zwischen WP_013345184.1 (*Ferrimonas balearica* DSM 9799) und WP_088211860.1 (*Shewanella* sp.

Shew256) (auf WP_088211860.1 bezogen), während die Sequenzidentität zwischen zwei Sequenzen der Deltaproteobakterien, WP_059437877.1 (*Anaeromyxobacter* sp. PSR-1) und WP_012527048.1 (*Anaeromyxobacter* sp. K) bei 95 % lag (auf WP_012527048.1 bezogen). Dies zusammen mit der Tatsache, dass die Sequenzen dieser Gruppe auch die längsten Äste im Baum besitzen (welche selbst proportional zum phylogenetischen Abstand der Sequenzen voneinander sind) deutet darauf hin, dass die in γ 2 beinhalteten Sequenzen die durchschnittlich höchste Divergenz besitzen, während die Sequenzen der Gruppe δ sich am ähnlichsten sind. Interessanterweise lässt sich die Gruppe ϵ 1 in zwei Untergruppen unterteilen, deren Mitglieder untereinander eine deutlich höhere Sequenzidentität besitzen als zwischen einander. Zwei repräsentative Sequenzen der größeren dieser Untergruppen, in Abbildung 42 als ϵ 1* gekennzeichnet, besitzen eine Identität von 77,1 % (WP_041571692.1 von *Wolinella succinogenes* und WP_103649933.1 von *Campylobacter concisus* AAUH-11UC-sig-a). Hingegen zeigten die Sequenzen WP_041571692.1 (*Wolinella succinogenes* DSM 1740) und WP_099341824.1 (*Arcobacter molluscorum* LMG 25693) eine Identität von nur 64,4 % (auf WP_099341824.1 bezogen). Allen MccA-Homologen der Gruppe ϵ 2 ist ein CX₁₇CH-Motiv gemein, über welches hypothetisch das Häm c 8 an das Protein gebunden wird. Die Sequenzen aller übrigen Gruppen hingegen besitzen an dessen Stelle ein CX₁₅CH-Motiv. Wie das *W. succinogenes*-MccA besitzen dessen Homologe mindestens zwei Cysteine, welche offenbar nicht in der Bindung einer Häm-Gruppe involviert sind, aber welche in MccA das Cu(I) koordinieren. MccA-Homologe, welche in Gruppe ϵ 1 einsortiert wurden, besitzen im Bereich, wo für das *W. succinogenes*-MccA C399 liegt, die Konsensus-Sequenz GPGCG. Homologe aller anderen Gruppen besitzen neben dem mit dem C399 in *W. succinogenes*-MccA korrespondierenden ein weiteres Cystein in einem konservierten Motiv. Beide Cystein-Reste sind hierbei durch einen Prolin- und entweder einen Alanin- oder Serin-Rest voneinander getrennt (Konsensus-Sequenz CPA/SC).

Tabelle 34. Übereinstimmung von Sequenzen innerhalb der im phylogenetischen Baum identifizierten Gruppen. Es wurden je zwei Sequenzen, welche auch auf gegenüberliegenden Enden jeder Gruppe befanden, miteinander verglichen.

Isolat	Nummer	Klasse	Zahl Aminosäuren	identische Reste	% Identität
<i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740	WP_041571692.1	ϵ 1*	660	509	77,1
<i>Campylobacter concisus</i> AAUH-11UC-sig-a	WP_103649933.1		660		77,1
<i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740	WP_041571692.1	ϵ 1	660	432	65,5
<i>Arcobacter molluscorum</i> LMG 25693	WP_099341824.1		671		64,4
<i>Turicimonas muris</i> YL45	WP_066593872.1	β 1	660	452	68,5
<i>Sutterella wadsworthensis</i> 59BFAA	WP_005434753.1		651		69,4

<i>Ferrimonas balearica</i> DSM 9799	WP_013345184.1		652		64,7
<i>Shewanella</i> sp. Shew256	WP_088211860.1	γ^1	687	422	61,4
<i>Anaeromyxobacter</i> sp. PSR-1	WP_059437877.1		626		96,8
<i>Anaeromyxobacter</i> sp. K	WP_012527048.1	δ	638	606	95,0
<i>Ferrimonas marina</i> DSM 16917	WP_082766776.1		632		57,0
<i>Edwardsiella piscicida</i> S07-534	WP_078057781.1	γ^2	644	360	55,9
<i>Sutterella</i> sp. 6FBBBH3	WP_120176503.1		622		83,6
<i>Sutterella wadsworthensis</i> 45B	WP_005429843.1	β^2	633	520	82,1
<i>Campylobacter curvus</i> 525.92	WP_011992789.1		636		80,0
<i>Campylobacter jejuni</i> BCW 6457	WP_070298071.1	ϵ^2	630	509	80,8

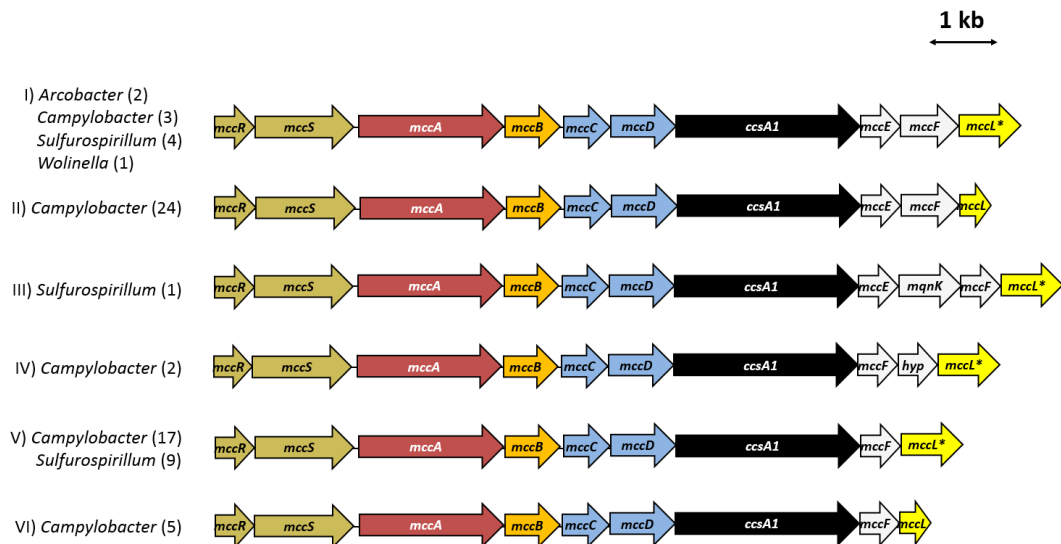
¹Sequenzlänge ohne Signalsequenz, welche mit SignalP4.0 ermittelt wurde

²Zahl der übereinstimmenden Aminosäure-Reste nach Vergleich mit ClustalW

6.7.2. Diversität der *mcc*-Gencluster

Gene, welche eine funktionelle Einheit bilden, sind in Bakterien oft in einem Gencluster organisiert. Damit ein MccA-Homolog als Teil eines Mcc-Sulfitreduktase-Systems funktionieren kann, befindet sich das korrespondierende Gen optimalerweise in einem *mcc*-Gencluster. Zur Charakterisierung der Diversität der *mcc*-Gencluster wurde die genetische Umgebung der Gene der MccA-Orthologe entweder auf syntän organisierte Gene in der Umgebung, oder auf Homologe der in *W. succinogenes* kodierten *mcc*-Gene hin untersucht. Es wurde untersucht, inwieweit Charakteristika wie das Vorhandensein eines CX₁₅CH- oder CX₁₇CH-Motivs sowie das Vorhandensein des zweiten konservierten Cystein-Restes nahe eines der beiden potenziell Cu(I)-bindenden Cysteine mit dem Typ des *mcc*-Genclusters korrelierten. In Epsilon-, Gamma-, und Betaproteobakterien befinden sich stromabwärts und gegebenenfalls auch stromaufwärts der Gene der MccA-Homologe konservierte Gene, welche zusammen als *mcc*-Gencluster aufgefasst wurden. Je nach Anzahl und Position der Gene sowie bakterieller Klasse wurden diese Gencluster dann in Typen unterteilt. Epsilonproteobakterien besitzen dabei zwei Typen von Genclustern, innerhalb derer die Anordnung der einzelnen Gene sehr ähnlich oder identisch ist, welche sich voneinander aber stark unterscheiden (Abbildung 43). Die MccA-Sequenzen, welche dem phylogenetischen Cluster I in **Kap. 6.7.1** zugeordnet wurden, werden ausschließlich in epsilonproteobakteriellen *mcc*-Genclustern des Typs I kodiert. Die übrigen MccA-Sequenzen aus *Campylobacter*-Isolaten, welche über ein CX₁₇CH-Motiv für Häm c 8 verfügen und einen phylogenetisch relativ großen Abstand zu den übrigen epsilonproteobakteriellen MccAs besitzen, werden in *mcc*-Genclustern des Typs II kodiert (vergleiche mit Abbildung 42).

Typ I



Typ II

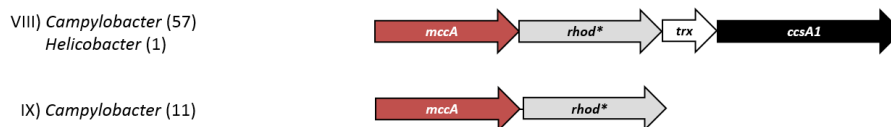


Abbildung 43. Die *mcc*-Gencluster aus Epsilonproteobakterien. Das Gen *rhod** kodiert für eine Rhodanase mit einer C-terminal fusionierten zusätzlichen Domäne, Gen *trx* für ein potenzielles Thioredoxin. Die Zahl hinter den Gattungen gibt die Anzahl der gefundenen Isolate, welche über einen *mcc*-Gencluster verfügen, an. Die Farbgebung anhand der Genprodukte ist wie folgt. Zweikomponentensystem: gelb-orange, Sulfitreduktase: dunkelrot, Cytochrom *c*-Synthase: schwarz, Cu-Chaperon: gelb, Peptidyl-*cis/trans*-Isomerase: orange, Elektronentransportproteine: blau, unbekannte Funktion für Sulfitreduktion: weiß. **mclL*-Gen besitzt zwei Cu(I)-Bindemotiven.

Der Typ I dieser Gencluster beinhaltet stets die Gene des Zweikomponentensystems *mccR* und *-S*, gefolgt von den Genen *mccA*, *-B*, *-C*, *-D* und *ccsA1* (Abbildung 44 Typ I). Stromabwärts hiervon sind Gencluster dieses Typs nicht mehr identisch, das letzte Gen kodiert aber stets für das potenzielle Kupferchaperon *MclL*. Die meisten Gencluster verfügen zwischen *ccsA1* und *mclL* über *mccE* und *-F*. In 33 der 68 Gencluster des Typs I aber fehlt *mccE*, wobei im Fall von *Campylobacter showae* CSUNSWCD *mccF* von einem hypothetischen, nicht zu *mccE* homologen Gen gefolgt wird und in *Campylobacter showae* 129 MSG sowohl *mccE* und *-F* fehlen und es stattdessen nur das hypothetische Gen besitzt. In einem Isolat von *Sulfurospirillum* sp. MES wurde ein *mcc*-Gencluster mit einem zu *hemN* homologen Gen zwischen *mccE* und *mccF* identifiziert (OA34_09505; *mqnK* in Abbildung 43 Typ I III)). Das kodierte Protein besitzt Motive, welche es den Klasse C rSAM-Methyltransferasen zuordnet. Das Genom dieses Isolats kodiert keine weitere putative Menachinon-Methyltransferase. Keines der weiteren Isolate von

Sulfurospirillum sp. MES verfügte über ein *mcc*-Gencluster, aber stattdessen über ein nicht *mcc*-assoziiertes *mqnK* (OA34_01320, OA34_04020, OA34_02120). 39 der *mcc*-Gencluster des Typs I verfügen über ein *mccL* mit zwei putativen Cu(I)-Bindemotiven, während die restlichen 29, welche alle *Campylobacter*-Vertretern zuzuordnen sind, einen kürzeren Leserahmen von *mccL* mit einem Cu(I)-Bindemotiv besitzen. Leserahmen mit zwei Cu(I)-Bindemotive sind in *mcc*-Genclustern anderer Bakterienklassen nicht vorhanden.

In Genomen von Vertretern der Gattung *Campylobacter* existiert ein weiterer Typ von *mcc*-Genclustern (Abbildung 43; Typ II). Bei diesen liegt stromabwärts von *mccA* das Gen für eine Rhodanase (PspE-Familie) vor, welche über eine zusätzliche C-terminale Domäne, die homolog zu Proteinen der PetB-Familie ist, verfügt. Dieses Protein wurde im Folgenden als multifunktionelle Rhodanase (*rhod**, mit Stern zur Abgrenzung von Rhodanase-Genen ohne Fusion abgekürzt) bezeichnet und ist ausschließlich in *mcc*-Genclustern von *Campylobacter*-Spezies anzutreffen. Bei 57 *Campylobacter*-Vertretern befindet sich stromabwärts des *rod/petB*-kodierenden Gens noch ein Gen für ein als Thioredoxin annotiertes Protein sowie ein *ccsA1*-Ortholog. Es wurden keine Gene identifiziert, dessen Produkte MccA mit Elektronen versorgen bzw. MccA mit dem Menachinonpool verbinden könnten. Dies schließt allerdings nicht aus, dass Gene für diese Proteine an anderer Stelle im Genom kodiert sind.

Abgesehen von Epsilonproteobakterien besitzen eine Reihe von Gammaproteobakterien wie beispielsweise Angehörige der Gattungen *Shewanella* und *Ferrimonas*, aber auch vereinzelt Betaproteobakterien *mcc*-Gencluster. Die Diversität der *mcc*-Gencluster in Gammaproteobakterien sind in Abbildung 44 und Abbildung 45 dargestellt. Anstelle der in Epsilonproteobakterien kodierten *CcsA1* des Cytochrom *c*-Synthesystems II nutzen Gammaproteobakterien das System I. Drei dieser Gene, *nrfE*, *-F* und *-G*, sind in den *mcc*-Genclustern kodiert. *NrfE* ist für die Bindung und den Transport der Häm-Gruppe, welcher vom CcmABCD-Komplex in das Periplasma transportiert wurde, zuständig. *NrfF* dient der Reduktion der Cysteine des CXXCH-Motivs des Protein-Substrates und das *NrfG* liefert zusammen mit *CcmH* die Häm-Gruppe an das Protein-Substrat [84]. Bis auf drei Isolate von *Shewanella* sowie eines von *Ferrimonas* werden stromaufwärts von *mccA* Gene dieses Systems (*nrfE*, *nrfF*) sowie ein Gen für ein potenzielles Thioredoxin entgegen der Leserichtung des restlichen Clusters kodiert (Abbildung 44). Dieses Thioredoxin ist nicht homolog (weniger als 25 % Identität) zu den Thioredoxinen der *Campylobacter*-Gencluster. Zusätzlich zu den in Epsilonproteobakterien gefundenen Genen besitzen diese Gencluster stromabwärts von *mccA* ein Gen für eine Rhodanase ohne zusätzliche PetB-Domäne, *nrfG* und ein *mccL*, dessen Genprodukt nur ein Cu(I)-Bindemotiv besitzt. Stromabwärts von *mccL* sind Homologe der für die NosZ-Reifung benötigten Proteine *NosD*, *-F* und *-Y* kodiert. Diese Proteine wurden als Lieferanden von

Schwefelspezies für das Cu₂-Zentrum von NosZ diskutiert [85][86]. Das letzte Gen des Genclusters kodiert für den möglichen Transkriptionsfaktor CadC, welcher mit Ausnahme eines *Ferrimonas*-Isolates ausschließlich in *Shewanella* gefunden wird.

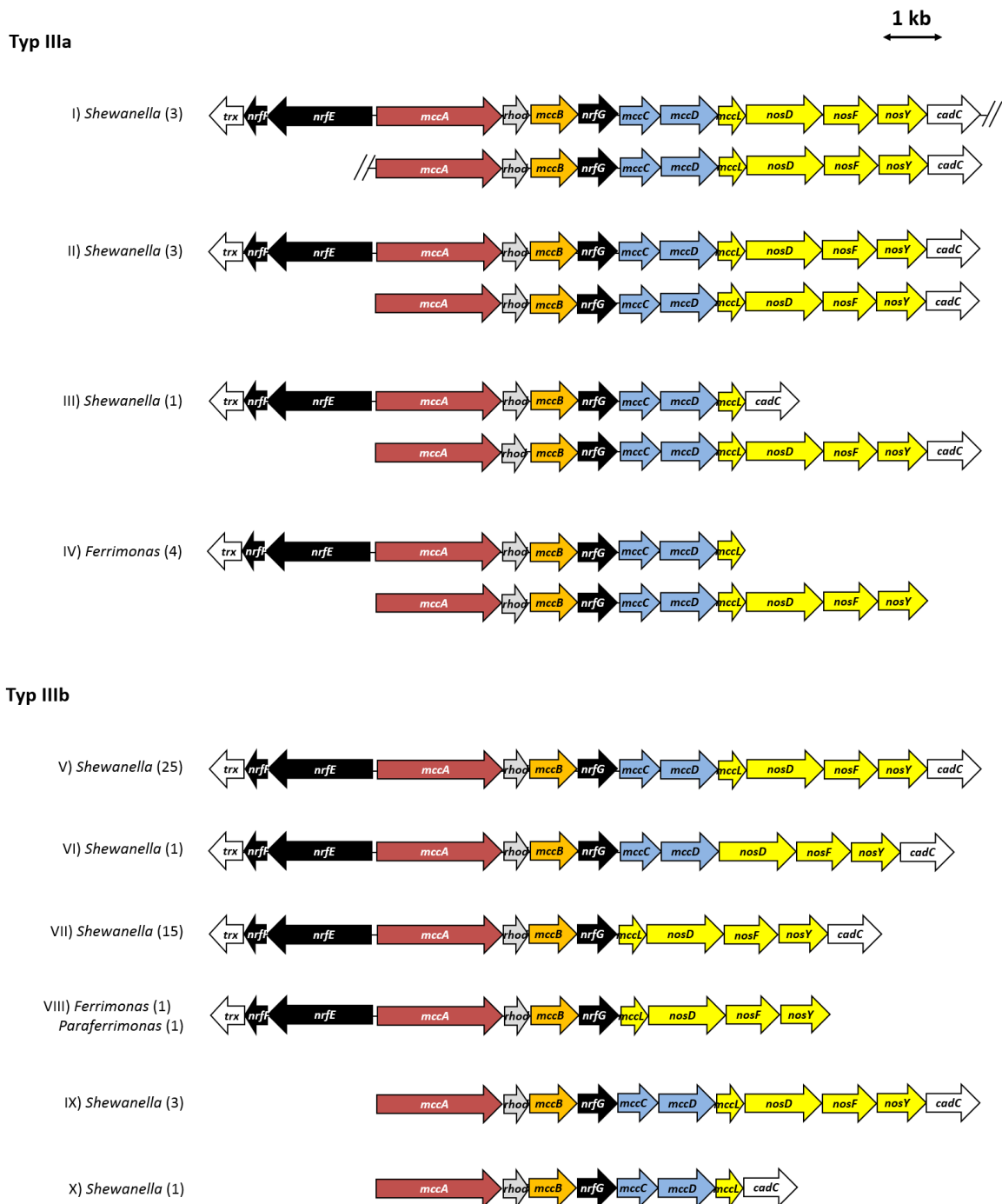


Abbildung 44. Diversität der gammaproteobakteriellen Typ III *mcc*-Gencluster. Doppelte Schrägstriche zwischen *cadC* und dem stromabwärts gelegenen *mccA* (Typ IIIa I)) zeigen das Vorhandensein nicht-konservierter Gene zwischen diesen Teilen des Genclusters. *rhod* bezeichnet das Gen einer Rhodanase der PspE-Familie ohne weitere fusionierte Domäne. Die Farbgebung anhand der Funktion der Genprodukte ist wie folgt: Cytochrom *c*-Synthase: schwarz, Sulfitreduktase: dunkelrot, Schwefelübertragung durch Rhodanase: grau, Peptidyl-*cis/trans*-Isomerase: orange, putativer Exporter von Schwefelspezies: gelb, Elektronentransportproteine: blau, unbekannte Funktion für Sulfitreduktion: weiß.

In 7 unterschiedlichen *Shewanella*-Isolaten sowie 4 *Ferrimonas*-Vertretern wurde ein teilweise dupliziertes *mcc*-Gencluster im Genom gefunden (Abbildung 44 Typ IIIa). Die Duplikation schließt mindestens die Gene *mccA* bis *mccL* ein, bei 6 der *Shewanella*-Stämme auch den *nosF*, *-Y* und *-L*-Lokus. Bei 3 der 7 *Shewanella*-Isolate, welche über ein dupliziertes Gencluster verfügen, sind die beiden duplizierten Bereiche durch 5 bis 13 nicht konservierte Genen getrennt, welche keine offensichtliche Funktion für den Mcc-Proteinkomplex besitzen. Die MccA-Orthologe in diesen Genclustern des Typs IIIa liegen im phylogenetischen Baum relativ nahe zueinander. Die MccA-Sequenzen der auf jeweils einem Gencluster des Typs IIIa befindlichen *mccA*-Gene liegen im Fall von *Ferrimonas*-Isolaten benachbart im phylogenetischen Baum, während die korrespondierenden Gene der *Shewanella*-Isolate einen größeren phylogenetischen Abstand besitzen.

Darüber hinaus existieren in Gammaproteobakterien noch Gencluster mit hiervon abweichender Architektur (Abbildung 45). *Ferrimonas*, *Budvicia* und *Leminorella* besitzen Gencluster mit *nrfG* und *nrfE*, welche in Leserichtung der anderen Gene liegen. Anstelle von *mccD* wird in den *mcc*-Genclustern von *Budvicia* und *Leminorella* *ydhU* kodiert, dessen Genprodukt nicht zu MccD homolog ist. In *Ferrimonas marina* DSM 16917 fehlen die Gene für Elektronen-transportierende Proteine gänzlich. In *Ferrimonas marina* DSM 16917 allerdings liegen zwischen *mccB* und *nrfG* die Gene für einen TonB-abhängigen Transporter für Siderophore und ein Thioredoxin. Vertreter der Gattung *Edwardsiella* verfügen über einen Gencluster, in welchem die Gene *mccC* und *ydhU* stromaufwärts von *mccA* liegen.

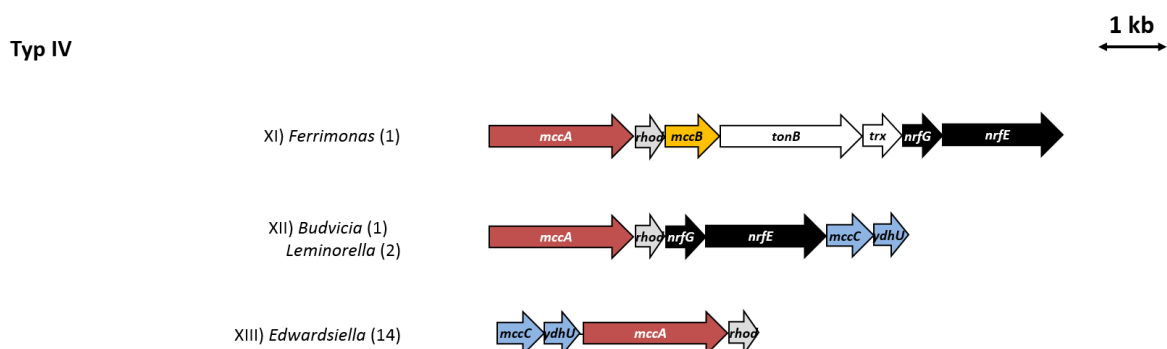


Abbildung 45. Diversität der Gammaproteobakteriellen *mcc*-Gencluster des Typs IV. Für die Farbgebung siehe Abbildung 44. *tonB* bezeichnet das Gen eines potenziellen Siderophor-Transporters.

16 Vertretern der Betaproteobakterien besitzen ebenfalls *mcc*-Gencluster (Abbildung 46). Diese ähneln in ihrem Aufbau denen der Gammaproteobakterien. Wie bei den Genclustern des Typs IIIa und IIIb liegt *nrfG* stromabwärts von *mccB*. Allerdings liegen auch die Gene *nrfE*, *nrfF* sowie

das Gen des potenziellen Thioredoxins in Leserichtung der weiteren *mcc*-Gene. Diese drei Gene sind stromabwärts der *nosD*, *-F*, *-Y*-Gene kodiert. In den Isolaten *Turicimonas muris* YL45, *Parasutterella excrementihominis* YIT 11859 sowie die beiden der Gattung *Burkholderia* zugeordneten Isolate *Burkholderiales bacterium* TF07-50 und *Burkholderiales bacterium* 1_1_47 wurden darüber hinaus Gene einer Histidin-Kinase sowie eines zur FixJ-Familie gehörenden Proteins, welche hypothetischerweise die Expression des *mcc*-Gene regulieren, vorgefunden. Das *mcc*-Gencluster einiger Vertreter der Gattung *Sutterella* gleicht in seinem Aufbau sehr denen der *Shewanella*-Isolate, es fehlen allerdings die Gene *mccC* und *mccD* bzw. *ydhU*. Andere Gencluster wirken stark reduziert und verfügen nur über *mccA* und ein Rhodanase-Gen. Für keines der entsprechenden Bakterien wurde die Fähigkeit der Sulfat-Atmung experimentell gezeigt.

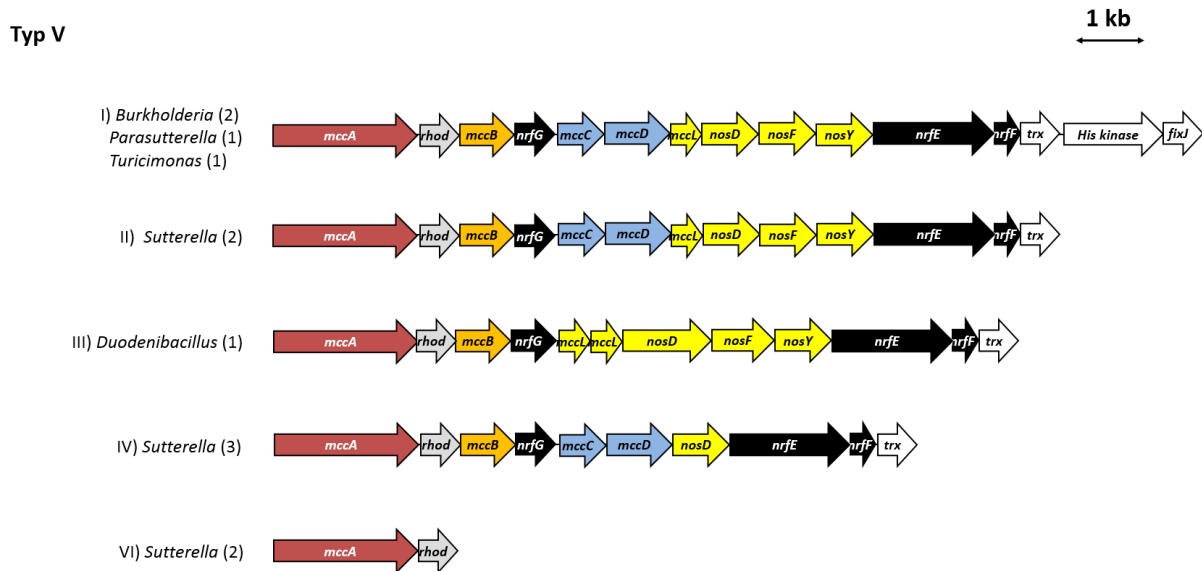


Abbildung 46. Variabilität der *mcc*-Gencluster innerhalb der Betaproteobakterien. *rhod* bezeichnet das Gen einer Rhodanase der PspE-Familie, *trx* bezeichnet das Gen eines potenziellen Thioredoxins. Für die Farbgebung siehe Abbildung 44.

Innerhalb der Epsilon-, Gamma- und Betaproteobakterien gibt es auch Isolate, welche das *mccA* unabhängig von einem Gencluster besitzen. Innerhalb der Epsilonproteobakterien wurde dieses „isolierte“ *mccA* in *Campylobacter pinnipediorum* subsp. *pinnipediorum* RM18813, *Campylobacter curvus* DSM 6644 und *Campylobacter curvus* 525.92 gefunden, innerhalb der Gammaproteobakterien nur in *Edwardsiella tarda* NCTC10396 und in Betaproteobakterien in *Sutterella* sp. 6FBBBH3 und *Sutterella wadsworthensis* DSM 14016. Darüber hinaus besitzen die Isolate *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1, *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C und *Anaeromyxobacter* sp. K als einzige Vertreter der Deltaproteobakterien ein (isoliert liegendes) *mccA*-Homolog.

6.7.3. Diskussion

Bakterien haben sich im Laufe ihrer Entwicklungsgeschichte immens diversifiziert und nehmen unterschiedlichste biologische Nischen ein. *W. succinogenes* ist ein Mitglied der Epsilonproteobakterien, welche allerdings aufgrund ihre großen phylogenetischen Distanz zu anderen Bakterienklassen als eigenständiges Phylum postuliert wurden [17]. Die große Anzahl und Verteilung über Epsilon-, Gamma-, Delta- und Betaproteobakterien, welche zum Teil unterschiedlichste Lebensräume und -weisen besitzen, lässt die Hypothese zu, dass Mcc-katalysierte Sulfitreduktion einen signifikant zur dissimilatorischen Sulfitreduktion beiträgt. Obwohl jeder Träger eines solchen Genclusters zur Mcc-katalysierten dissimilatorischen Sulfitreduktion in der Lage sein könnte, ist die physiologische Rolle der einzelnen MccA-Homologe nicht geklärt. Bisher wurde die Mcc-katalysierte dissimilatorische Sulfitreduktion nur in *W. succinogenes* sowie in *S. oneidensis* MR-1 [16] demonstriert. Möglicherweise besitzen MccA-Orthologe abhängig vom Organismus neben der Sulfitreduktion auch andere Aufgaben. Interessanterweise besitzen Homologe mit Ausnahme von epsilonproteobakteriellen MccA-Proteine ein zweites Cystein nahe des mit dem C399 in *W. succinogenes*-MccA korrespondierenden Rest. Wie in *W. succinogenes*-MccA sind diese beiden Cysteine aufgrund von in der Sequenz beinhalteten Prolin-, Serin und Alanin-Reste möglicherweise Teil eines flexiblen Motives. Dies lässt vermuten, dass in den anderen MccA-Orthologen dieses weitere Cystein ebenfalls eine Rolle in der Bindung von Cu(I) im aktiven Zentrum hat. Es wäre möglich, dass bei diesen Orthologen Cu(I) nicht wie bei *W. succinogenes*-MccA linear, sondern komplexer koordiniert wird. Darüber hinaus ist möglich, dass dieses Motiv aus einem CX₂CH-Bindemotiv nach Austausch des Histidin-Restes hervorging. Dieses mutierte im Vorfahren aller MccA-Homologe zu einem CP/ASC-Motiv und schließlich im Vorfahren der Gruppe ε1 zu einem GPGCG-Motiv. Ein weiterer auffälliger Unterschied ist das Vorhandensein eines CX₁₇CH-Bindemotives ausschließlich in Vertretern der Gruppe ε2, dessen Leserahmen ausschließlich in Genclustern des Typs II vorliegen. Allen Genclustern des Typs II fehlt darüber hinaus *mccB*. Es wäre möglich, dass durch die beiden zusätzlichen Aminosäure-Reste im Motiv andere sterische Eigenschaften resultieren und keine benachbarte Schleife mit *cis*-Peptid zur Stabilisierung notwendig ist. Da allerdings auch kein *mccB* in Genclustern des Typs IV XIII) (14 *Edwardsiella*-Isolate) und in Typ V VI) (2 *Sutterella*-Isolate) vorkommt, schließen sich CX₁₇CH-Motive und *mccB* nicht aus. Sofern keine andere Peptidyl-*cis/trans*-Isomerase die Rolle von *mccB* bei diesen Isolaten übernimmt, könnte auch ein CX₁₅CH-Bindemotiv ohne benachbartes *cis*-Peptid stabilisiert werden. Epsilonproteobakterielle *mcc*-Genclusters des Typs I besitzen einen hohen Grad an Synthänie. Vertreter der Gattung *Sulfurospirillum* sind in Sedimenten nachgewiesen worden und könnten dort auch Sulfit umsetzen. Die Gene der Gencluster Typ III der

Gammaproteobakterien sowie des Typs V der Betaproteobakterien sind ebenfalls konserviert. Obwohl die Gene für den Elektronentransport zu MccA homolog zu denen der Epsilonproteobakterien sind, unterscheiden sich mit Ausnahme von *mccB* die Gene, deren Produkte für die Reifung der Sulfitreduktase zuständig sind. Die Rolle der Genprodukte von *nosDFY* für das Mcc-System ist unklar, der hohe Grad an Konservierung außerhalb der Epsilonproteobakterien deutet aber auf eine Funktion entweder bei der Reifung oder der Aktivität hin. Der NosDFY-Komplex wird zwar als Transporter für niedermolekulare Komponenten diskutiert, eine definitive Rolle dieser Proteine ist aber nicht klar, zumal keine für den Transport zuständige Domäne identifiziert werden konnte. Da nach heutigem Kenntnisstand im Periplasma keine schwefelhaltigen Kofaktoren in Mcc-Proteinen assembliert werden, scheint eine Rolle als Transporter für Schwefelspezies unwahrscheinlich. NosD-Homologe existieren als Fusionsproteine mit NosL-Homologen, was die Hypothese zulässt, dass NosD und NosL zur Interaktion in der Lage sind. Anstelle eines Transporters für Schwefelspezies wäre es möglich, dass ein NosDFY-Komplex NosL rekrutiert [87]. Somit wäre der NosDFY-Komplex ein möglicher Vermittler zwischen NosL und dem Cu(I)-erhaltenden Enzym, in diesem Fall MccA.

Von den *mcc*-Genclustern tragenden Vertretern der Gattung *Arcobacter* wurden *A. marinus* aus Meerwasser isoliert, ist aber möglicherweise auch mit im Meer lebenden Organismen assoziiert [88]. *Arcobacter molluscorum*, wie der Name annehmen lässt, scheint vornehmlich in Muscheln vorzukommen [89][90]. Dass mit Ausnahme der Anaeromyxobacter-MccAs alle Bakterienklassen über zwei phylogenetisch getrennte Gruppen an MccA-Sequenzen verfügen, spricht für zwei horizontale Gentransfer-Ereignisse zwischen diesen Gruppen. Dass sowohl bekannte Krankheitserreger als auch mutmaßlich ökologisch wichtige Organismen über *mcc*-Gencluster verfügen, kann entweder in einem gemeinsamen Vorfahren der Stämme dieser Isolate oder aber durch horizontalen Gentransfer begründet sein. Freilebende und wirtsabhängige Organismen kommen über die Nahrungskette sowie Frisch- und Meerwasserkreisläufe regelmäßig miteinander in Kontakt. Beschrieben wurde dies beispielsweise für *Campylobacter jejuni*, dessen Stämme über *mcc*-Gencluster Typ II verfügen [91].

Gammaproteobakterien spielen in manchen Sedimenten möglicherweise eine wichtige Rolle in der Umwandlung von Stickstoff-Spezies und möglicherweise auch bei Schwefel-Spezies [92] und *Shewanella*-Vertreter wie *Shewanella oneidensis* sind in der Lage, eine Reihe von Elektronenakzeptoren (unter anderem auch Metallionen wie Mn(IV) oder U(VI)) zu atmen [93][94]. *Shewanella*-Vertreter wie *S. putrefaciens*, oder *S. baltica* sind aber auch als Zersetzer von Meeresfischen beschrieben worden [95][96]. Allerdings ist mit Ausnahme des oben

beschriebenen Bakteriums *Shewanella* sp. MR-1 nicht bekannt, inwieweit dissimilatorische Sulfitreduktion bei *mcc*-Gencluster tragenden Gammaproteobakterien relevant ist. Die *mcc*-Gencluster besitzenden Vertreter der Betaproteobakterien sind bisher nicht als Sulfitatmer beschrieben worden. Über die mögliche Rolle der MccA-Homologe in *Anaeromyxobacter dehalogenans* ist ebenfalls nicht bekannt. Dieser Organismus wurde aus organischen Sedimenten isoliert und könnte dort ebenfalls unter anderem Sulfit atmen. Da hier aber das *mccA* isoliert liegt, wäre eine andere Rolle als die einer Sulfitreduktase nicht auszuschließen.

7. AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde die Rolle der Gene des *mcc*-Genclusters von *W. succinogenes* zum ersten Mal unter Sulfitatmung charakterisiert. Bisher ist eine solch detaillierte Charakterisierung der einzelnen Gene eines *mcc*-Genclusters noch nicht durchgeführt worden.

Der putative Antwortregulator MccR wurde als essenziell für die Induktion des *mcc*-Genclusters identifiziert. MccR mit intaktem C-Terminus erlaubte es *W. succinogenes*, MccA innerhalb von etwa 4 h nach Kontakt mit Sulfit zu produzieren, was durch die zu diesem Zeitpunkt beginnende Sulfitatmung deutlich wurde. MccR bildet mit der Sensorkinase MccS vermutlich ein Zweikomponentensystem, welches die Produktion der Mcc-Proteine abhängig von Sulfit reguliert. Fortführend zu den bisherigen Ergebnissen kann dieses Zweikomponentensystem mit der Charakterisierung von MccS weitergehend untersucht werden. Da MccS offenbar eine Häm c-Gruppe besitzt, welche über das konservierte CXXCH-Motiv an das Protein gebunden ist, kann dieses Motiv variiert werden, um den Einfluss auf die Fähigkeit zur sulfitabhängigen Produktion von MccA zu testen. Einhergehend hiermit kann Wildstamm-MccS oder dessen Proteinvarianten homolog oder heterolog produziert, gereinigt und anschließend spektroskopisch mit oder ohne Sulfit-Exposition untersucht werden, um die Bindung und elektrochemische Änderung des Häm c nachzuweisen.

Die Rolle der antisense-RNA, deren Gen innerhalb von *mccA* kodiert liegt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Um deren Rolle näher zu betrachten, können Zellen von *W. succinogenes* DSM 1740 und von *W. succinogenes mccR⁺ cat* sowohl in Formiat-Fumarat- als auch Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium bis in die exponentielle Phase vermehrt und anschließend mittels Transkriptomanalyse verglichen werden. Die vergleichende Analyse der Transkriptmengen zwischen Wildstamm und Mutante kann Aufschluss über die Antisense-RNA sowie die Rolle von MccR und -S geben.

Das Modell des in der Einleitung erläuterten Sulfitreduktase-Systems von *W. succinogenes*, wurde in dieser Arbeit bestätigt. Der (8-M)MKH₂-Dehydrogenase-Komplex MccCD ist demnach die einzige Verbindung zwischen MccA und dem Chinonpool. Bisher konnte allerdings die Stöchiometrie des MccCD-Komplexes nicht geklärt werden. Es wird angenommen, dass er entweder als Heterodimer oder -Tetramer vorliegt. Die Interaktion zwischen MccA und -C konnte aber bisher nicht demonstriert werden. Da mittels Gelfiltration interagierende Proteine unter nicht-denaturierenden Bedingungen ihrer Größe nach aufgetrennt werden, könnte die hypothetische Interaktion zwischen MccA und -C bzw. MBP-TEV-MccC-Strep hiermit gezeigt werden. Eine schwache Interaktion sollte sich dabei durch zusätzliche Fraktionen, welche vor den Fraktionen, die MccA-twS und (MBP-TEV-)MccC-Strep enthalten, zu erkennen sein. Auch

das Oligomerisierungsverhalten von MccC kann mittels Auftrennung auf einer Gelfiltrations-Säule überprüft werden. Hier sollte allerdings beachtet werden, dass, auch wenn MccC als Monomer auf der Säule detektiert werden sollte, die Oligomerisierung *in vivo* nicht ausgeschlossen werden kann, da MccD dann möglicherweise die Basis für die Dimerisierung bildet.

Für die Sulfitatmung ist der Aminosäure-Rest F158 in MccC wichtig. Um die Frage zu klären, ob F158 mutmaßlich eher für den Elektronentransport oder für die Stabilität des Protein-Zentrums zuständig ist, könnten die in **Kap. 6.4.1** und **6.4.2** beschriebenen F158-Varianten von MccC sowie MccC-twS kristallisiert werden. Unterschiede in der Position der [4Fe4S]-Zentren und der Aminosäuren im Protein-Innern gäben Auskunft über stabilisierende Rolle des Phenylalanins. Je weniger sich die Strukturen des Protein-Zentrums und die Position der [4Fe4S]-Zentren zwischen Wildstamm-MccC, MccC_F158L und MccC_F158W voneinander unterscheiden, desto wahrscheinlicher wäre es, dass die Aminosäure als Überbrückung zwischen den beiden zentralen [4Fe4S]-Zentren dient. MccD besitzt die konservierten Aminosäure-Reste W17, Y24 und Y161 welche mutmaßlich für die Bindung von Chinonen wichtig sind. Zum anderen wurden mehrere hydrophile Aminosäure-Reste entdeckt, welche zwischen MccD, dessen Homologen und in PscC konserviert sind und als hypothetischen Protonentunnel dienen könnten, wahrscheinlich aber in MccD für die Transmembrandomänen-Stabilität wichtig sind. Sofern MccD in Zukunft in Zell-Lysaten immunologisch nachgewiesen wird, könnten diese Aminosäure-Reste gegen Alanin ausgetauscht und das Vorhandensein von MccD überprüft werden. Sollten diese Aminosäure-Reste für die Stabilität von MccD wichtig sein, so sollte sich dies nach Austausch gegen Alanin in der Abwesenheit von MccD widerspiegeln.

MccL ist für das Vorhandensein von Cu(I) in MccA nicht notwendig, wohl aber für dessen vollständige Beladung. Für die Funktion von MccL in *W. succinogenes* ist das Vorhandensein der beiden putativen Cu(I)-Bindemotive notwendig. Von Interesse wäre, die Bindung von Cu(I) durch die Cu(I)-Bindemotive genauer zu untersuchen. Sofern die Beladung von MccL mit Cu(I) gelänge, ohne dass das Protein präzipitiert, könnte die Kristallstruktur von MccL gelöst und somit die Cu(I)-Bindung durch die Cystein-Reste mit gegebenenfalls Involvierung des Methionins gezeigt werden. Hierdurch würde eventuell geklärt werden, inwiefern die beiden Cu(I)-Bindemotive von MccL zusammenwirken, um ein mono- oder multinukleares Cu(I)-Zentrum zu stabilisieren. Durch Deletion anderer putativer Kupferchaperone in *W. succinogenes* *mccR⁺ cat* könnten andere für die Beladung von MccA wichtige andere Proteine identifiziert werden.

Eine geeignete Methode, um die Interaktion von Komponenten des Mcc-Systems zu untersuchen, ist die Blau-Nativ-Gelelektrophorese, bei welcher Membranproteine und -proteinkomplexe unter nicht-denaturierenden Bedingungen getrennt werden. Hier würden solubilisierte Membranen von *W. succinogenes*-Zellen, welche in Formiat-Fumarat-Medium vermehrt wurden mit solchen von in Formiat-Sulfit-Medium wuchsen, verglichen. Durch eine anschließende SDS-PAGE (zusammen mit der Blau-Nativ-Gelelektrophorese eine 2D-PAGE) und anschließende Identifikation der Proteine mittels Massenspektrometrie können die beteiligten Mcc-Proteine und eventuell bisher nicht identifizierte Komponenten identifiziert werden.

Es wurden MccA-Homologe in einer Reihe von in Epsilon- und Gammaproteobakterien, aber auch in Beta- und Deltaproteobakterien identifiziert. Aufgrund der unterschiedlichen Cytochrom *c*-Synthase-Systeme kann versucht werden, MccA-Orthologe aus Bakterienklassen mit System I in *W. succinogenes* produzieren zu lassen. Die Spezifität kann ebenfalls überprüft werden, indem versucht wird, ein in *mcc*-Gencluster Typ II kodiertes MccA, welches ein CX₁₇CH-Motiv enthält, in *W. succinogenes* produzieren zu lassen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Hell R, Dahl C, Knaff DB, Leustek T (2008) Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms. *Adv Photosynth Resp*, Springer, Luxemburg, **27**: 224–225
- [2] Simon J, Kroneck PM (2018) Microbial sulfite respiration. *Adv Microb Physiol*, **62**: 45–117
- [3] Gunnison AF (1981) Sulphite toxicity: A critical review of in vitro and in vivo data. *Food Cosmet Toxicol*, **19**: 667–682
- [4] Hsieh YC, Liu MY, Wang VC, Chiang YL, Liu EH, Wu WG, Chan SI, Chen CJ (2010) Structural insights into the enzyme catalysis from comparison of three forms of dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio gigas*. *Mol Microbiol*, **78**: 1101–1116
- [5] Parey K, Warkentin E, Kroneck PM, Ermler U (2010) Reaction cycle of the dissimilatory sulfite reductase from *Archaeoglobus fulgidus*. *Biochemistry*, **49**: 8912–8921
- [6] Schiffer A, Parey K, Warkentin E, Diederichs K, Huber H, Stetter KO, Kroneck PM, Ermler U (2008) Structure of the dissimilatory sulfite reductase from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *J Mol Biol*, **379**: 1063–1074
- [7] Oliveira TF, Vonrhein C, Matias PM, Venceslau SS, Pereira IA, Archer M (2008) The crystal structure of *Desulfovibrio vulgaris* dissimilatory sulfite reductase bound to DsrC provides novel insights into the mechanism of sulfate respiration. *J Biol Chem*, **283**: 34141–34149
- [8] Santos AA, Venceslau SS, Grein F, Leavitt WD, Dahl C, Johnston DT, Pereira IA (2015) A protein trisulfide couples dissimilatory sulfate reduction to energy conservation. *Science*, **350**: 1541–1545
- [9] Pires RH, Venceslau SS, Morais F, Teixeira M, Xavier AV, Pereira IA (2006) Characterization of the *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 DsrMKJOP complex--a membrane-bound redox complex involved in the sulfate respiratory pathway. *Biochemistry*, **45**: 249–262
- [10] Grein F, Pereira IA, Dahl C (2010) Biochemical characterization of individual components of the *Allochromatium vinosum* DsrMKJOP transmembrane complex aids understanding of complex function in vivo. *J Bacteriol*, **192**: 6369–6377
- [11] Hermann B, Kern M, La Pietra L, Simon J, Einsle O (2015) The octahaem MccA is a haem c-copper sulfite reductase. *Nature*, **520**: 706–709
- [12] Kern M, Klotz MG, Simon J (2011) The *Wolinella succinogenes* mcc gene cluster encodes an unconventional respiratory sulphite reduction system. *Mol Microbiol*, **82**: 1515–1530

-
- [13] Hartshorne RS, Kern M, Meyer B, Clarke TA, Karas M, Richardson DJ, Simon J (2007) A dedicated haem lyase is required for the maturation of a novel bacterial cytochrome *c* with unconventional covalent haem binding. *Mol Microbiol*, **64**: 1049–1060
- [14] Kern M, Eisel F, Scheithauer J, Kranz RG, Simon J (2010) Substrate specificity of three cytochrome *c* haem lyase isoenzymes from *Wolinella succinogenes*: unconventional haem *c* binding motifs are not sufficient for haem *c* attachment by NrfI and CcsA1. *Mol Microbiol*, **75**:122–137
- [15] Kern M, Scheithauer J, Kranz RG, Simon J (2010) Essential histidine pairs indicate conserved haem binding in epsilonproteobacterial cytochrome *c* haem lyases. *Microbiology*, **156**:3773–3781
- [16] Shirodkar S, Reed S, Romine M, Saffarini D (2011) The octahaem SirA catalyses dissimilatory sulfite reduction in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Environ Microbiol*, **13**: 108–115
- [17] Waite DW, Vanwonterghem I, Rinke C, Parks DH, Zhang Y, Takai K, Sievert SM, Simon J, Campbell BJ, Hanson TE, Woyke T, Klotz MG, Hugenholtz P (2017) Comparative Genomic Analysis of the Class Epsilonproteobacteria and Proposed Reclassification to Epsilonbacteraeota (phyl. nov). *Front Microbiol*, **8**: 682
- [18] Waite DW, Vanwonterghem I, Rinke C, Parks DH, Zhang Y, Takai K, Sievert SM, Simon J, Campbell BJ, Hanson TE, Woyke T, Klotz MG, Hugenholtz P (2018) Erratum: Addendum: Comparative Genomic Analysis of the Class Epsilonproteobacteria and Proposed Reclassification to Epsilonbacteraeota (phyl. nov). *Front Microbiol*, **9**: 772
- [19] Kruse S, Goris T, Westermann M, Adrian L, Diekert G (2018) Hydrogen production by *Sulfurospirillum* species enables syntrophic interactions of Epsilonproteobacteria. *Nat Commun*, **9**: 4872
- [20] Wolin, MJ, Wolin EA, Jacobs NJ (1961) Cytochrome-producing anaerobic *Vibrio*, *Vibrio succinogenes*, sp. n.. *J Bacteriol*, **81**: 911–917
- [21] Dietrich W, Klimmek O (2002) The function of methyl-menaquinone-6 and polysulfide reductase membrane anchor (PsrC) in polysulfide respiration of *Wolinella succinogenes*. *Eur J Biochem*, **269**: 1086-1095
- [22] Thauer RK, Jungermann K, Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev*, **41**: 100–180
- [23] Hein S, Klimmek O, Polly M, Kern M, Simon J (2017) A class C radical S-adenosylmethionine methyltransferase synthesizes 8-methylmenaquinone. *Mol Microbiol*, **104**: 449–462

-
- [24] Nasiri HR, Panisch R, Madej MG, Bats JW, Lancaster CR, Schwalbe H (2009) The correlation of cathodic peak potentials of vitamin K(3) derivatives and their calculated electron affinities. The role of hydrogen bonding and conformational changes. *Biochim Biophys Acta*, **1787**:601–608
- [25] Hein S, von Irmer J, Gallei M, Meusinger R, Simon J (2018) Two dedicated class C radical *S*-adenosylmethionine methyltransferases concertedly catalyse the synthesis of 7,8-dimethylmenaquinone. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, **1859**: 300–308
- [26] Simon J, Hederstedt L (2011) Composition and function of cytochrome *c* biogenesis System II. *FEBS J*, **278**: 4179–4188
- [27] Bokranz M, Katz J, Schröder I, Robertson AM, Kröger A (1983) Energy metabolism and biosynthesis of *Vibrio succinogenes* growing with nitrate or nitrite as terminal electron acceptor. *Arch Microbiol*, **135**: 36–41
- [28] Eller J, Hein S, Simon J (2019) Significance of MccR, MccC, MccD, MccL and 8-methylmenaquinone in sulfite respiration of *Wolinella succinogenes*. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, **1860**: 12–21
- [29] Kröger A, Geisler V, Duchene A (1994) Isolation of *Wolinella succinogenes* hydrogenase. Chromatofocusing. In: Jagow G, Schägger H (1994) A practical guide for membrane protein purification. *Academic Press*, San Diego, California: 141–148.
- [30] Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **51**: 263–273
- [31] Engler C, Kandzia R, Marillonnet S (2008) A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLoS ONE*, **3**: e3647
- [32] Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*, **6**: 343–345
- [33] Gornall AG, Bardawill CJ and David, MM (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, **177**: 751–766
- [34] Bradford MM (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
- [35] Weber K, Osborn M (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*, **244**: 4406–4412

-
- [36] Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680–685
- [37] Francis RT and Becker RR (1984). Specific indication of hemoproteins in polyacrylamide gels using a double-staining process. *Anal Biochem*, **136**: 509–514
- [38] Collins PF, Diehl H, Smith GF (1959) [2,4,6-Tripyridyl-s-triazine as Reagent for Iron. Determination of Iron in Limestone, Silicates, and Refractories. *Analytical Chemistry*, **31**: 1862–1867
- [39] Yano T, Sled' VD, Ohnishi T, Yagi T (1996) Expression and characterization of the flavoprotein subcomplex composed of 50-kDa (NQO1) and 25-kDa (NQO2) subunits of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem*, **271**: 5907–5913
- [40] Hanna PM, Tamilarasan R, McMillin DR (1988) Cu(I) analysis of blue copper proteins. *Biochem J*, **256**: 1001–1004
- [41] Felsenfeld G (1960) The determination of cuprous ion in copper proteins. *Arch Biochem Biophys*, **87**: 247–251
- [42] Ralle M, Lutsenko S, Blackburn N (2003) X-ray absorption spectroscopy of the copper chaperone HAH1 reveals a linear two-coordinate Cu(I) center capable of adduct formation with exogenous thiols and phosphines. *J Biol Chem*, **278**: 23163–23170
- [43] Pachmayer F (1960) Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen in Mineralwasser. Doktorarbeit. *Ludwig Maximilians Universität, München*
- [44] King ET, Morris RO (1967) Determination of acid-labile sulfide and sulfhydryl groups. *Meth Enzymol*, **10**: 634–641
- [45] Bergmeyer H (1974), Methoden der enzymatischen Analyse. *Verlag Chemie, Weinheim*.
- [46] Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, **5**: 725–738
- [47] Berman MH, Westbrook J, Feng ZK, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, **28**: 235–242
- [48] Jormakka M, Yokoyama K, Yano T, Tamakoshi M, Akimoto S, Shimamura T, Curmi P, Iwata S (2008) Molecular mechanism of energy conservation in polysulfide respiration. *Nat Struct Mol Biol*, **15**: 730–737

-
- [49] Unden G, Bongaerts J (1997) Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim Biophys Acta*, **1320**: 217–234
- [50] Lorenzen JP, Kröger A, Unden G (1993) Regulation of anaerobic respiratory pathways in *Wolinella succinogenes* by the presence of electron acceptors. *Arch Microbiol*, **159**: 477–483
- [51] Jiang J, Chan A, Ali S, Saha A, Haushalter KJ, Lam WL, Glasheen M, Parker J, Brenner M, Mahon SB, Patel HH, Ambasadhan R, Lipton SA, Pilz RB, Boss GR (2016) Hydrogen Sulfide--Mechanisms of Toxicity and Development of an Antidote. *Sci Rep*, **6**: 20831
- [52] Okabe S, Nielsen PH, Jones WL, Characklis WG (1995) Sulfide product inhibition of *Desulfovibrio desulfuricans* in batch and continuous cultures. *Water Res*, **29**: 571–578
- [53] TM, Arciero DM, Hsu BT, Logan MS, Hooper AB, Rees DC (1998) Heme packing motifs revealed by the crystal structure of the tetra-heme cytochrome *c*₅₅₄ from *Nitrosomonas europaea*. *Nat Struct Biol*, **5**: 1005–1012
- [54] Einsle O (2001) Cytochrome *c* nitrite reductase. In: Messerschmidt A, Huber R, Wieghardt K, Poulos T, (eds.) (2001) Handbook of Metalloproteins. *John Wiley & Sons*, New York
- [55] Stach P, Einsle O, Schumacher W, Kurun E, Kroneck PMH (2000) Bacterial cytochrome *c* nitrite reductase: new structural and functional aspects. *J Inorg Biochem*, **79**: 381–385
- [56] Simon J, Gross R, Einsle O, Kroneck PM, Kröger A, Klimmek O (2000) A NapC/NirT-type cytochrome *c* (NrfH) is the mediator between the quinone pool and the cytochrome *c* nitrite reductase of *Wolinella succinogenes*. *Mol Microbiol*, **35**: 686–696
- [57] Einsle O, Stach P, Messerschmidt A, Klimmek O, Simon J, Kröger A, Kroneck PM (2002) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the membrane-bound cytochrome *c* nitrite reductase complex (NrfHA) from *Wolinella succinogenes*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**: 341–342
- [58] Bennett SP, Soriano-Laguna MJ, Bradley JM, Svistunenko DA, Richardson DJ, Gates AJ, Le Brun NE (2019) NosL is a dedicated copper chaperone for assembly of the Cu₂ center of nitrous oxide reductase. *Chem Sci*, **10**: 4985–4993
- [59] Mandal SK, Thompson LK, Gabe EJ, Lee FL, Charland JP (1987) Spontaneous reduction of copper(II) complexes of the ligand 3,6-bis(2-pyridylthio)pyridazine. Crystal structures of bis[3,6-bis(2-pyridylthio)pyridazine-N1,N2]aquocopper(II) diperchlorate trihydrate and bis[μ-3,6-bis(2-pyridylthio)pyridazine-N4,μ-N1,μ-N2,N3]dicopper(I) diperchlorate. *Inorg Chem*, **26**: 2384–2389

-
- [60] Kitagawa S, Munakata M, Higashie A (1984) Autoreduction of copper(II) complexes of 6,6'-dialkyl-2,2'-bipyridine and characterization of their copper(I) complexes. *Inorganica Chim Acta*, **84**: 79–84
- [61] Mittl PR, Schneider-Brachert W (2007) Sel1-like repeat proteins in signal transduction. *Cell Signal*, **19**: 20–31
- [62] Schmidt TG, Batz L, Bonet L, Carl U, Holzapfel G, Kiem K, Matulewicz K, Niermeier D, Schuchardt I, Stanar K (2013) Development of the Twin-Strep-tag® and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants. *Protein Expr Purif*, **92**: 54–61
- [63] Klotz MG and Stein LY (2011) Genomics of ammonia-oxidizing bacteria and insights into their evolution. In: Ward, BB, Klotz MG, and Arp DJ (eds.) (2011) *Nitrification*. ASM Press, Washington DC: 57–94
- [64] Upadhyay AK, Hooper AB, Hendrich MP (2006) NO reductase activity of the tetraheme cytochrome *c*₅₅₄ of *Nitrosomonas europaea*. *J Am Chem Soc*, **128**: 4330–4337
- [65] Riggs P (2000) Expression and purification of recombinant proteins by fusion to maltose-binding protein. *Mol Biotechnol*, **15**: 51–63
- [66] Bach H, Mazor Y, Shaky S, Shoham-Lev A, Berdichevsky Y, Gutnick DL, Benhar I (2001) *Escherichia coli* maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies. *J Mol Biol*, **312**: 79–93
- [67] Haase D, Hermann B, Einsle O, Simon J (2017) Epsilonproteobacterial hydroxylamine oxidoreductase (ϵ Hao): characterization of a 'missing link' in the multiheme cytochrome *c* family. *Mol Microbiol*, **105**: 127–138
- [68] Chandramouli K, Unciuleac MC, Naik S, Dean DR, Huynh BH, Johnson MK (2007) Formation and properties of [4Fe-4S] clusters on the IscU scaffold protein. *Biochemistry*, **46**: 6804–6811
- [69] Khoroshilova N, Popescu C, Münck E, Beinert H, Kiley P (1997). Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 6087–6092
- [70] Mapolelo DT, Zhang B, Naik SG, Huynh BH, Johnson MK (2012) Spectroscopic and functional characterization of iron-sulfur cluster-bound forms of *Azotobacter vinelandii* (Nif)IscA. *Biochemistry*, **51**: 8071–8084

-
- [71] Li ZP, Nimtz M, Rinas U (2014) The metabolic potential of *Escherichia coli* BL21 in defined and rich medium. *Microb Cell Fact*, **13**: 45–62
- [72] Simon J, van Spanning RJ, Richardson DJ (2008) The organisation of proton motive and non-proton motive redox loops in prokaryotic respiratory systems. *Biochim Biophys Acta*, **1777**: 1480–1490
- [73] Sawers G, Richardson D (2002) Structural biology. PMF through the redox loop. *Science*, **295**: 1842–1843
- [74] Simon J, Klotz MG (2013) Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations. *Biochim Biophys Acta*, **1827**: 114–135
- [75] Kröger A, Biel S, Simon J, Gross R, Uden G, Lancaster CR (2002) Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism. *Biochim Biophys Acta*, **1553**: 23–38
- [76] Geisler V, Ullmann R, Kröger A (1994) The direction of the proton exchange associated with the redox reactions of menaquinone during electron transport in *Wolinella succinogenes*. *BBA Bioenergetics*, **1184**: 219–226
- [77] Cobine PA, George GN, Jones CE, Wickramasinghe WA, Solioz M, Dameron CT (2002) Copper transfer from the Cu(I) chaperone, CopZ, to the repressor, Zn(II)CopY: metal coordination environments and protein interactions. *Biochemistry*, **41**: 5822–5829
- [78] Lamb AL, Wernimont AK, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV, Rosenzweig AC (1999) Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Nat Struct Biol*, **6**: 724–729
- [79] Wernimont AK, Huffman DL, Lamb AL, O'Halloran TV, Rosenzweig AC (2000) Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins. *Nat Struct Mol Biol*, **7**: 766–771
- [80] Hearnshaw S, West C, Singleton C, Zhou L, Kihlken MA, Strange RW, Le Brun NE, Hemmings AM (2009) A tetranuclear Cu(I) cluster in the metallochaperone protein CopZ. *Biochemistry*, **48**: 9324–9326
- [81] Singleton C, Hearnshaw S, Zhou L, Le Brun NE, Hemmings AM (2009) Mechanistic insights into Cu(I) cluster transfer between the chaperone CopZ and its cognate Cu(I)-transporting P-type ATPase, CopA. *Biochem J*, **424**: 347–356
- [82] Badarau A, Firbank SJ, McCarthy AA, Banfield MJ, Dennison, C (2010) Visualizing the Metal-Binding Versatility of Copper Trafficking Sites. *Biochemistry*, **49**: 7798–7810

-
- [83] Klimmek O, Dietrich W, Dancea F, Lin YJ, Pfeiffer S, Löhr F, Rüterjans H, Gross R, Simon J, Kröger A (2004) Sulfur respiration. In: Zannoni D (ed.) (2004) Respiration in Bacteria and Archaea. *Springer*, Dordrecht: 217–232
- [84] Kranz RG, Richard-Fogal C, Taylor JS, Frawley ER (2009) Cytochrome *c* biogenesis: mechanisms for covalent modifications and trafficking of heme and for heme-iron redox control. *Microbiol Mol Biol Rev*, **73**: 510–528
- [85] Wunsch P, Herb M, Wieland H, Schiek UM, Zumft WG (2003) Requirements for Cu_A and Cu-S Center Assembly of Nitrous Oxide Reductase Deduced from Complete Periplasmic Enzyme Maturation in the Nondenitrifier *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol*, **185**: 887–896
- [86] Simon J, Einsle O, Kroneck PM, Zumft WG (2004) The unprecedented *nos* gene cluster of *Wolinella succinogenes* encodes a novel respiratory electron transfer pathway to cytochrome *c* nitrous oxide reductase. *FEBS Lett*, **569**: 7–12
- [87] Hein S, Simon J (2019) Bacterial nitrous oxide respiration: electron transport chains and copper transfer reactions. *Adv Microb Physiol*, **75**. In press.
- [88] Kim HM, Hwang CY, Cho BC (2010) *Arcobacter marinus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, **60**: 531–536
- [89] Miller WG, Yee E, Bono JL (2018) Complete Genome Sequence of the *Arcobacter molluscorum* Type Strain LMG 25693. *Microbiol Resour Announc*, **7**. pii: e01293–18
- [90] Figueras MJ, Collado L, Levican A, Perez J, Solsona MJ, Yustes C (2011) *Arcobacter molluscorum* sp. nov., a new species isolated from shellfish. *Syst Appl Microbiol*, **34**: 105–109
- [91] Baily JL, Méric G, Bayliss S, Foster G, Moss SE, Watson E, Pascoe B, Mikhail J, Pizzi R, Goldstone RJ, Smith DG, Willoughby K, Hall AJ, Sheppard SK, Dagleish MP (2015) Evidence of land-sea transfer of the zoonotic pathogen *Campylobacter* to a wildlife marine sentinel species. *Mol Ecol*, **24**: 208–221
- [92] Franco DC, Signori CN, Duarte RT, Nakayama CR, Campos LS, Pellizari VH (2017) High Prevalence of Gammaproteobacteria in the Sediments of Admiralty Bay and North Bransfield Basin, Northwestern Antarctic Peninsula. *Front Microbiol*, **8**: 153
- [93] Dikow RB (2011) Genome-level homology and phylogeny of *Shewanella* (Gammaproteobacteria: Iteromonadales: Shewanellaceae). *BMC Genomics*, **12**: 237
- [94] Tiedje JM (2002) *Shewanella*--the environmentally versatile genome. *Nat Biotechnol*, **20**: 1093–1094

[95] Jørgensen BR, Huss HH (1989) Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish. *Int J Food Microbiol*, **9**: 51–62

[96] Fonnesbech Vogel B, Venkateswaran K, Satomi M, Gram L (2005) Identification of *Shewanella baltica* as the most important H₂S-producing species during iced storage of Danish marine fish. *Appl Environ Microbiol*, **71**: 6689–6697

[97] Kröger A, Innerhofer A (1976) The function of the *b* Cytochromes in the Electron Transport from Formate to Fumarate of *Vibrio succinogenes*. *Eur J Biochem*, **69**: 497–506

9. ANHANG

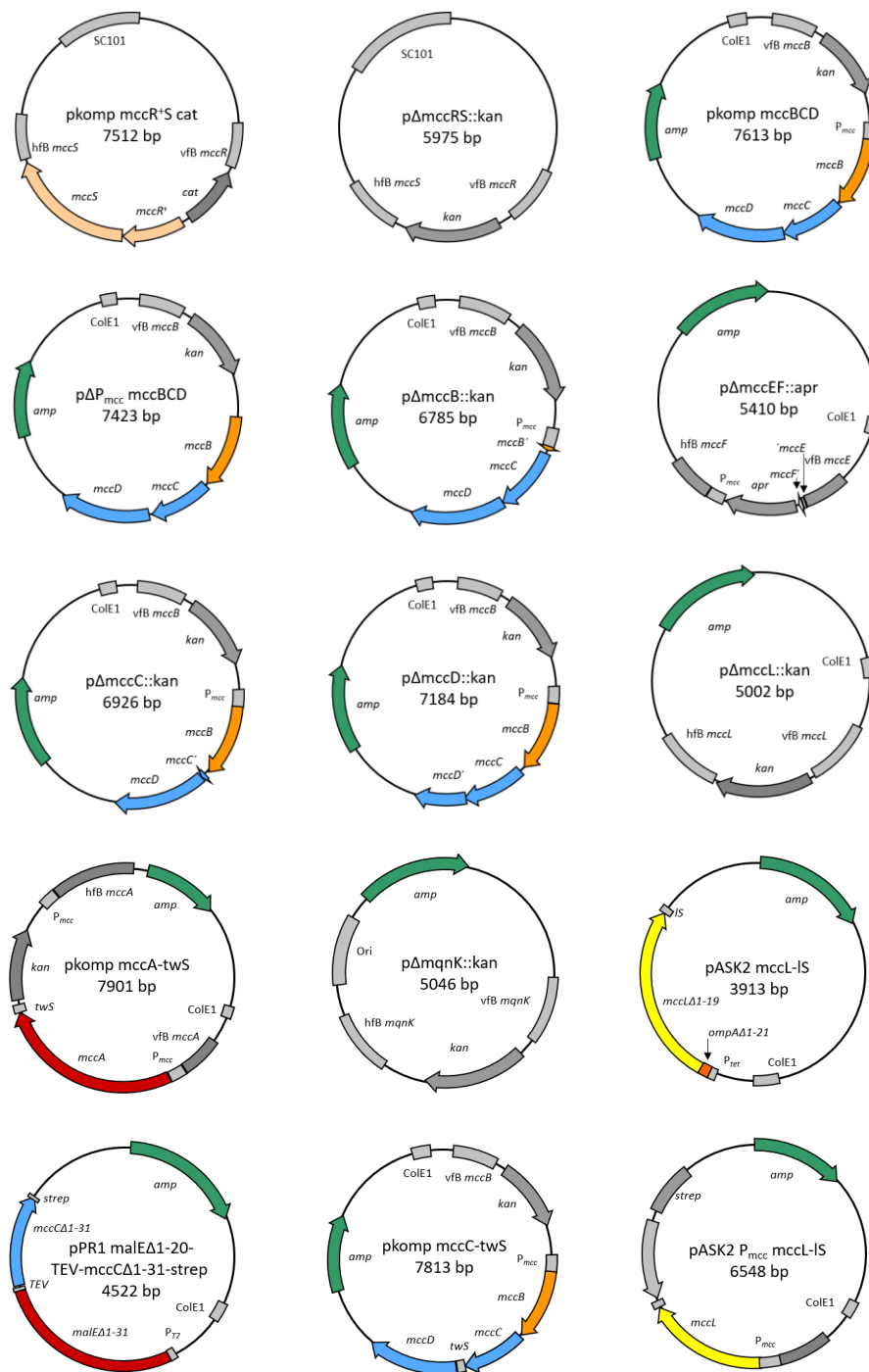


Abbildung 47. Karten der Plasmide für die Erstellung der *W. succinogenes*- und *E. coli*-Mutanten. Für die Plasmid-Vermehrung oder Transformation des Zielorganismus wichtige Komponenten sind hervorgehoben.

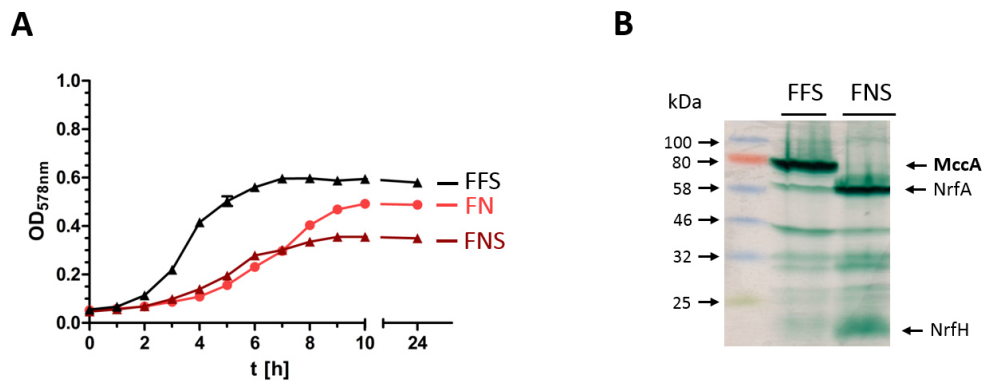


Abbildung 48. Charakterisierung der MccA-Produktion abhängig von Nitrat-Zusatz. **A:** Wachstum von *W. succinogenes mccR⁺ cat* auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium (FFS), Formiat-Nitrat-Medium (FN) oder Formiat-Nitrat-Medium, welches mit 10 mM Sulfit (FNS) supplementiert wurde. Jede Wachstumskurve wurde mit 3 biologischen Replikaten ermittelt. **B:** Nachweis von Cytochromen *c* von Kulturen auf Formiat-Fumarat-Sulfit- oder Formiat-Nitrat-Sulfit-Medium. Zellen wurden nach etwa 12 h Wachstum geerntet und mittels SDS-PAGE getrennt. Anschließend wurden die Cytochrome *c* mittels Häm-Färbung nachgewiesen. Pro Spur wurden 200 μg Protein aufgetragen. Für die Zusammensetzung des Formiat-Nitrat-Mediums in Kap. 5.4.1.

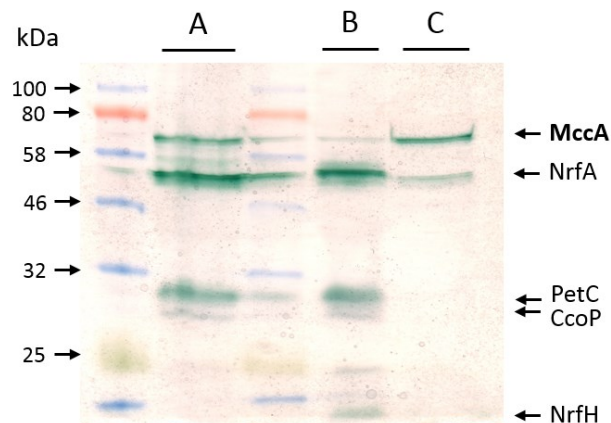
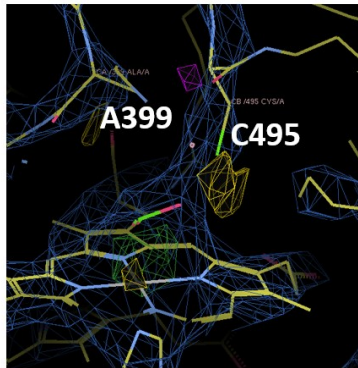


Abbildung 49. Untersuchung der Membran-Assoziation von MccA. Eine Kultur von *W. succinogenes mccR⁺ cat* wurde etwa 12 h auf Formiat-Fumarat-Sulfit-Medium vermehrt. 200 μg Protein an Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und der Ansatz anschließend in zwei Aliquots geteilt. Während eines der Aliquots nicht weiter getrennt wurde und den kompletten Zellen entsprach (A), wurde das zweite für 10 min bei 16100 rcf und 4 °C zentrifugiert. Hiernach wurde der Überstand, welche die löslichen Proteine enthielt (C) vom Sediment (B) mit den Membran-assoziierten Proteinen getrennt. Diese drei Proben wurden mittels SDS-PAGE getrennt und anschließend die Cytochrome *c* über Häm-Färbung nachgewiesen.

MccA_C399A-twS



MccA_C495A-twS

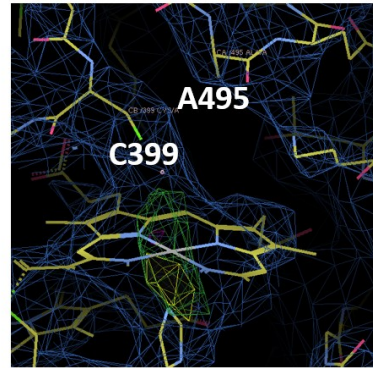


Abbildung 50. Elektronendichtekarten von kristallisiertem MccA_C399A-twS und MccA_C495A-twS. Die Auflösung der Elektronendichte von MccA_C399A-twS betrug 3,5 Å, die von MccA_C495A-twS 4 Å. Die Aminosäure-Reste 399 und 495, welche bei Wildstamm-MccA beides Cysteine sind und das Cu(I) binden, sind gekennzeichnet. Vergleiche mit [11].

10. PUBLIKATIONEN

Eller J, Hein S, Simon J (2019) Significance of MccR, MccC, MccD, MccL and 8-methylmenaquinone in sulfite respiration of *Wolinella succinogenes*. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, **1860**: 12–21

11. PRÄSENTATION AUF WISSENSCHAFTLICHEN KONGRESSEN

Posterpräsentation auf der Jahres-Tagung der „Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie“ 05.03. – 08.03.2017 in Würzburg

Posterpräsentation auf der Tagung „Bacterial electron transfer processes & their regulation“ 11.03. – 14.03.2018 in St. Tropez (FR)

Posterpräsentation auf der Jahres-Tagung der „Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie“ 15.04. – 18.04.2018 in Wolfsburg

Vortrag auf der Jahres-Tagung der „Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie“ 17.03. – 20.03.2019 in Mainz

12. BEITRÄGE ANDERER

Die Plasmide pCOLA Fe/S kan, p Δ mccL::kan, p Δ mccRS::kan, p Δ comp mccR⁺S cat sowie p Δ mqnK::kan wurden von Dr. Melanie Kern erstellt.

Die Gelfiltrationen von MccA-twS, MccA_C399A-twS, MccA_C495A-twS und MccA_C399A_C495A-twS wurden von M.Sc. Lukas Denkhaus (Promotionsstudierender) im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Einsle der Albert-Ludwig-Universität Freiburg durchgeführt.

Die Cyclovoltammetrie sowie die Chronoamperometrie von MccA-twS und MccA_C399A-twS wurden von Dr. Daniel Tekverk im Arbeitskreis von Prof. Dr. Sean Elliott der Boston Universität aufgenommen.

Die Isolierung der Chinone aus *W. succinogenes* wurden von Dr. Sascha Hein in diesem Arbeitskreis durchgeführt.

13. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörg Simon für die Vergabe des Themas, die konstante Begutachtung, Betreuung sowie Unterstützung meiner Forschung und Dissertation und viele anregende Gespräche, welche meine Arbeit erst möglich machten.

Dank gilt auch PD Dr. Arnulf Kletzin für die Betreuung meiner Arbeit als Zweitgutachter.

Ich danke Dr. Melanie Kern für die Unterstützung zu Beginn meiner Arbeit und die Bereitstellung bestimmter Plasmide, welche Teile meiner Forschung deutlich vereinfachten.

Ich bedanke mich bei M.Sc. Lukas Denkhaus und M.Sc. Benedikt Prasser des Arbeitskreises unter Prof. Einsle in Freiburg für die anregenden Diskussionen und die Hilfe bei der Charakterisierung und für die Kristallisation von Wildstamm MccA sowie der Cysteinaustausch-Varianten.

Weiterer Dank gilt Dr. Daniel Tekverk des Arbeitskreises unter Prof. Elliot der Boston University für die Analyse von MccA-twS und MccA_C399A-twS mittels Proteinfilm-Voltammetrie und Chronoamperometrie.

Vielen Dank auch allen derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppen AG Simon, AG Pfeifer und AG Kletzin für die experimentelle und persönliche Unterstützung, nicht zuletzt durch die Bereitschaft, mich bei Mangel stets mit Verbrauchsmaterialien und Chemikalien zu versorgen.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Familie und Freunden für deren konstante Unterstützung und Motivation während dieser Zeit.

14. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht. Die eingereichte elektronische Version stimmt mit der schriftlichen Version überein

Darmstadt, der 23.09.2019

Jakob Eller