

Die Sulfid:Chinon Oxidoreduktase (SQR) des Wattwurms
Arenicola marina: Funktion, Mechanismus und Evolution

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ursula Theißen

aus Mönchengladbach

Oktober 2006

Aus dem Institut für Botanik III
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. William Martin
Korreferent: Prof. Dr. Manfred Grieshaber

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2006

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Zustimmung des Betreuers in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Martin W, Rotte C, Hoffmeister M, Theissen U, Gelius-Dietrich G, Ahr S, Henze K (2003) Early cell evolution, eukaryotes, anoxia, sulfide, oxygen, fungi first (?), and a tree of genomes revisited. IUBMB Life 55: 193-204.

Theissen U, Hoffmeister M, Grieshaber M, Martin W (2003) Single eubacterial origin of eukaryotic Sulfide:Quinone Oxidoreductase, a mitochondrial enzyme conserved from the early evolution of eukaryotes during anoxic and sulfidic times. Mol. Biol. Evol. 20 (9): 1564-1574.

Tagungsbeiträge:

Theissen U, Hebing P, Martin W: The alternative oxidase from *Euglena gracilis*. Annual Meeting of the Society of Protozoologists, Smithfield, USA 2004.

Theissen U, Martin W: The Eukaryotic Sulfide:Quinone Oxidoreductase (SQR): function and evolution. FEBS Advanced Course on Origin and Evolution of Mitochondria and Chloroplasts. Wildbad Kreuth, 2005.

Theissen U, Martin W: The mitochondrial sulfide:quinone oxidoreductase (SQR): function, mechanism and evolution. Gordon Research Conference "Enzymes, Coenzymes and Metabolic Pathways". University of New England, Maine, USA 2006.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	4
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	7
1. EINLEITUNG	9
1.1 BAKTERIELLE SULFIDOXIDATION.....	9
1.2 SULFID IN LEBENSÄUMEN VON EUKARYOTEN	10
1.3 DIE ENTGIFTUNG VON SULFID.....	12
1.4 DIE MITOCHONDRIEN DES WATTWURMS <i>ARENICOLA MARINA</i> ALS ORT DER SULFIDENTGIFTUNG	13
1.5 DIE EUKARYOTISCHE SULFID:CHINON OXIDOREDUKTASE.....	14
1.6 DIE BEDEUTUNG VON SULFID IN DER ERDGESCHICHTE.....	15
1.7 ZIELE DER VORLIEGENDEN ARBEIT	16
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 CHEMIKALIEN	17
2.2 REAGENZSÄTZE.....	17
2.3 ENZYME	17
2.4 ORGANISMEN	18
2.4.1 <i>Arenicola marina</i>	18
2.4.2 <i>Drosophila melanogaster</i>	18
2.4.3 <i>Escherichia coli</i>	18
2.4.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.5 VEKTOREN	19
2.6 OLIGONUKLEOTIDE	19
2.7 ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN.....	22
2.7.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Arenicola marina</i>	22
2.7.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Drosophila melanogaster</i> und anschließende cDNA-Synthese	23
2.7.3 Reinigung von poly(A) ⁺ - RNA aus Gesamt-RNA von <i>Arenicola marina</i>	23
2.7.4 Herstellung einer cDNA-Bank aus <i>Arenicola marina</i>	23
2.7.5 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	24
2.7.6 Identifizierung rekombinanter Klone.....	24
2.7.7 In vivo Ausschleusung von Einzelklonen einer cDNA-Bank.....	25
2.7.8 Isolierung von Plasmid-DNA.....	25
2.7.9 Sequenzierung nach Sanger.....	25
2.7.10 Polymerase-Kettenreaktion	26
2.7.11 Klonierung von PCR-Fragmenten.....	26
2.8 ARBEITEN MIT <i>ESCHERICHIA COLI</i>	26
2.8.1 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> - Zellen.....	27
2.8.2 Elektroporation von <i>E. coli</i> - Zellen	27
2.8.3 <i>E. coli</i> - Expressionskulturen.....	27
2.8.4 Aufschluss von <i>E. coli</i> - Expressionskulturen	27
2.9 ARBEITEN MIT <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	28
2.9.1 Hefe-Medien	28
2.9.2 Herstellung kompetenter Hefezellen.....	28
2.9.3 Hefetransformation.....	29
2.9.4 Hefe-Expressionskulturen.....	29
2.9.5 Isolierung von Hefemitochondrien	29
2.9.6 Isolierung der Hefemitochondrienmembranen.....	30
2.10 REINIGUNG DER SQR/HIS AUS DER HEFEMITOCHONDRIENMEMBRAN	30
2.11 BIOCHEMISCHE METHODEN	31
2.11.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	31
2.11.2 SDS-PAGE.....	31
2.11.3 Färbung von Proteingelen.....	32
2.11.3.1 Coomassiefärbung	32
2.11.3.2 Silberfärbung	32
2.11.4 Western Blot	32
2.11.5 Immunodetektion	33
2.11.6 Enzymatische Tests zur Bestimmung der SQR-Aktivität.....	33

2.11.6.1 Cyanid-abhängiger SQR-Aktivitätstest	33
2.11.6.2 Thioredoxin-abhängiger SQR-Aktivitätstest	34
2.11.7 Arbeiten mit Sulfid	34
2.11.8 Bestimmung von Sulfid, Sulfit und Thiosulfat mittels HPLC.....	35
2.11.9 Bestimmung von Thiocyanat	35
2.12 SEQUENZSPECIFISCHE MUTAGENESE	36
2.13 BIOINFORMATISCHE METHODEN	37
2.13.1 Sequenzanalyse	37
2.13.2 Datenbankvergleiche	37
2.13.3 Phylogenetische Analysen.....	37
2.13.4 Voraussagen über mögliche Transitpeptide.....	38
2.13.5 Berechnung des Molekulargewichts und des isoelektrischen Punkts.....	38
2.14 AUSWERTUNG DER KINETISCHEN DATEN	38
3. ERGEBNISSE	39
3.1 ISOLIERUNG DES <i>SQR</i> -GENS VON <i>ARENICOLA MARINA</i> AUS EINER CDNA-BANK	39
3.2 IDENTIFIZIERUNG VON <i>SQR</i> -FINGERPRINTS UND KONSERVIERTEN BEREICHEN	41
3.3 HETEROLOGE ÜBEREXPRESSION DER SULFID:CHINON OXIDOREDUKTASE AUS <i>ARENICOLA MARINA</i> IN <i>E. COLI</i>	43
3.4 HETEROLOGE EXPRESSION DER SULFID:CHINON OXIDOREDUKTASE AUS <i>ARENICOLA MARINA</i> IN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> UND REINIGUNG ÜBER EINE NiNTA-AFFINITÄTSMATRIX.....	45
3.4.1 Expression der <i>SQR/His</i> in <i>S. cerevisiae</i>	45
3.4.2 Reinigung der <i>SQR/His</i> über eine NiNTA-Affinitätsmatrix.....	47
3.5 BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER <i>SQR/HIS</i>	50
3.5.1 Cyanid-abhängige Aktivitätsmessung	50
3.5.1.1 K_m -Wert für Sulfid	50
3.5.1.2 K_m -Wert für decyl-Ubichinon	51
3.5.1.3 K_m -Wert für Cyanid	51
3.5.1.4 pH-Abhängigkeit der <i>SQR/His</i> -Aktivität	52
3.5.1.5 Hemmung der <i>SQR/His</i> -Aktivität durch Antimycin A.....	53
3.5.2 Thioredoxin-abhängige Aktivitätsmessung	54
3.5.2.1 K_m -Wert für Sulfid	55
3.5.2.2 K_m -Wert für Sulfit	56
3.6 BESTIMMUNG VON ENDPRODUKTEN.....	57
3.6.1 Messung von Thiosulfat, Sulfit und Sulfid mittels HPLC.....	57
3.6.2 Nachweis von Thiocyanat	60
3.7 SEQUENZSPECIFISCHE MUTAGENESE	61
3.8 PHYLOGENETISCHE ANALYSE DER <i>SQR</i>	62
4. DISKUSSION	66
4.1 ISOLIERUNG DES <i>SQR</i> -GENS AUS <i>ARENICOLA MARINA</i> , HETEROLOGE EXPRESSION UND REINIGUNG DER <i>SQR</i>	66
4.1.1 Isolierung des <i>sqr</i> -Gens	66
4.1.2 Heterologe Expression der <i>SQR</i> in <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	67
4.1.3 Reinigung der <i>SQR/His</i> aus <i>S. cerevisiae</i>	67
4.2 SPECIFISCHE AKTIVITÄT, SUBSTRATE, SUBSTRATAFFINITÄTEN UND SEQUENZVERGLEICHE	68
4.2.1 Die Cyanid-abhängige Aktivität – wahrscheinlich ein Artefakt?.....	68
4.2.2 Thioredoxin als möglicher Schwefelakzeptor	70
4.2.3 Fingerprints und Konservierung der <i>SQR</i>	72
4.3 DER REAKTIONSMCHANISMUS DER MITOCHONDRIALEN <i>SQR</i>	74
4.3.1 Die reduktive Halbreaktion.....	74
4.3.2 Die oxidative Halbreaktion.....	77
4.4 DIE PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER MITOCHONDRIALEN <i>SQR</i>	78
4.4.1 Thiosulfat als Endprodukt der Sulfidentgiftung?	78
4.4.2 Thiosulfatbildung in den Mitochondrien des Wattwurms?	79
4.4.3 Eine Schwefel-Dioxygenase bei Eukaryoten?	80
4.4.4 Geringe Sauerstoff- und hohe Sulfidkonzentrationen – ein Problem?.....	81
4.4.4 <i>SQR</i> und Sulfid in höheren Eukaryoten	83
4.5 DIE EVOLUTION DER <i>SQR</i> ODER „HATTE DER VORFAHR DER MITOCHONDRIEN EINE <i>SQR</i> ?“	85
4.6 AUSBLICK.....	86
5. LITERATURVERZEICHNIS	88

6. ANHANG	100
1. ZUGANGSNUMMERN DER VERWENDETEN SQR-SEQUENZEN.....	100
2. ZUGANGSNUMMERN ANDERER SEQUENZEN.....	101
ZUSAMMENFASSUNG	102
ABSTRACT	104

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäuren
Asp	Aspartat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cys	Cystein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dUQ	decyl-Ubichinon
dUQH ₂	decyl-Ubichinol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavinadenindinukleotid (oxidierte Form)
FADH	Flavinadenindinukleotid (reduzierte Form)
FPLC	Fast-Protein-Liquid-Chromatography
g	Gramm
Glu	Glutamat
h	Stunde
His	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl Einzelmessungen
NADPH	Nicotinamidadenindinkleotidphosphat (reduzierte Form)
NiNTA	Nickel Nitriloessigsäure
OTU	Operational taxonomical unit

ox.	oxidiert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMS	Post mitochondrial supernatant (Post mitochondrieller Überstand)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
red.	reduziert
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SQR	Sulfid:Chinon Oxidoreduktase
SQR/His	Sulfid:Chinon Oxidoreduktase mit einer C-terminalen Histidinfusion
Sulfid	Sammelbegriff für H_2S , HS^- und S^{2-}
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRX	Thioredoxin
TRX-Red	Thioredoxin-Reduktase
U	Unit = $\mu\text{mol}/\text{min}$
UQ	Ubichinon
UQH ₂	Ubichinol
ÜN	Über Nacht
Val	Valin
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

„Das gelbe Element und seine erstaunliche Vielfältigkeit“, so schrieb Steudel (1996) über den Schwefel. Kein anderes Element kommt in so unterschiedlichen Molekülgrößen vor wie Elementarschwefel (S_0)– von S_2 über S_6 , S_7 , S_8 bis hin zu Makromolekülen (S_∞). Elementarschwefel ist in den meisten Umgebungen auch in Anwesenheit von Sauerstoff stabil, er kann jedoch leicht von schwefeloxidierenden Bakterien zu Sulfat oxidiert werden (Madigan, Martinko und Parker 2001). Sulfat wiederum wird durch sulfatreduzierende Bakterien reduziert und es entsteht Sulfid, das in wässriger Lösung als gasförmiger Schwefelwasserstoff vorliegt.

Aus Sicht der menschlichen Gesundheit wird Sulfid meist als Gift eingestuft: es hemmt die mitochondriale Atmungskette, indem es an Cytochrom aa_3 des Komplexes IV bindet (Nicholls 1975). Enzyme wie zum Beispiel die Uricase, die Glutathionperoxidase oder die Katalase werden ebenfalls durch Sulfid gehemmt. Es reduziert Disulfidbrücken oder bindet an Proteine, bevorzugt an solche des Häm-Typs (Evans 1967; National Research Council 1979; Beauchamp *et al.* 1983; Arp *et al.* 1987).

1.1 Bakterielle Sulfidoxidation

Für Prokaryoten ist Sulfid kein Gift, sondern eine wertvolle Energiequelle. Viele chemotrophe (Kelly *et al.* 1997) und phototrophe (Brune 1995) Bakterien sind in der Lage, mit Sulfid als einziger Elektronenquelle zu leben. Auch Vertreter der Archaeen besitzen die Fähigkeit, Sulfid zu oxidieren (Stetter 1996). In Eubakterien wird Sulfid in der Regel durch das Flavocytochrom c (FCC), ein lösliches periplasmatisches Enzym, das Elektronen von Sulfid auf Cytochrom c überträgt (VanBeeumen *et al.* 1991), oder das Flavoprotein Sulfid:Chinon Oxidoreduktase (SQR, auch als Sulfid Chinon Reduktase bezeichnet) oxidiert. Der Energiegewinn ist bei der SQR-Reaktion größer als bei der FCC-Reaktion, da sie am energetisch höher gelegenen Ubichinon der Atmungskette ansetzt. SQR katalysiert die folgende Reaktion:



Die Biochemie der bakteriellen SQR wurde bereits eingehend untersucht (Reinartz *et al.* 1998; Griesbeck, Hauska und Schütz 2000). Die Enzyme aus *Rhodobacter capsulatus* (Schütz *et al.* 1997) und *Oscillatoria limnetica* (Arieli *et al.* 1994) wurden gereinigt

und kloniert. Aus *Chlorobium limicola* (Shahak *et al.* 1992), *Rhodobacter capsulatus* (Shahak *et al.* 1994), *Paracoccus denitrificans* (Schütz *et al.* 1998), *Allochromatium vinosum* (Reinartz *et al.* 1998) und *Aquifex aeolicus* (Nübel *et al.* 2000) (zusammengefasst in Griesbeck, Hauska und Schütz 2000) wurde die SQR biochemisch charakterisiert. Bei der bakteriellen SQR handelt es sich um ein einzelnes, membran-assoziiertes Polypeptid mit einem Molekulargewicht zwischen 48 und 55 kDa. Vermutlich ist es als Dimer aktiv und gehört zur Glutathion Reduktase-Familie der Flavoproteine. Durch Chinon-Analoga wie Antimycin A, Stigmatellin oder Myxothiazol in micro- oder nanomolaren Konzentrationen wird die SQR aus Bakterien gehemmt (Arieli *et al.* 1994; Schütz *et al.* 1997; Griesbeck *et al.* 2002). In *Chlorobium* und *Rhodobacter* werden die Elektronen von Sulfid durch die SQR in die Elektronentransportkette der anaeroben Photosynthese eingespeist (Griesbeck, Hauska und Schütz 2000; Griesbeck *et al.* 2002), bei dem nicht-photosynthetischen α -Proteobakterium *Paracoccus denitrificans* (Schütz *et al.* 1998) und in *Aquifex aeolicus* (Nübel *et al.* 2000) leitet die SQR die Elektronen des Sulfids in die Atmungskette (Griesbeck, Hauska und Schütz 2000).

1.2 Sulfid in Lebensräumen von Eukaryoten

Für Bakterien scheint Sulfid ein „tägliches Brot“ zu sein, doch auch Eukaryoten können den Kontakt mit dem potentiellen Gift nicht immer vermeiden.

Viele tausende Meter unter der Meeresoberfläche befinden sich dort, wo die Platten der Erdkruste auseinanderspreizen, so genannte Hydrothermalquellen. Die Quellen sind häufig heiß (350 °C), anoxisch und enthalten hohe Sulfidkonzentrationen. Hier ist kein Leben möglich, doch etwas höher, wo die Thermalflüssigkeiten auf das umgebende Wasser treffen, lebt z.B. *Riftia pachyptila*, ein riesiger Röhrenwurm ohne Verdauungstrakt. Die Temperatur beträgt hier nur noch weniger als 50 °C, doch die Sulfidkonzentrationen übersteigen immer noch 300 μ M (van Dover 2000).

Ebenfalls marin, jedoch im Küstengewässer, lebt der Wattwurm *Arenicola marina* L (Abb.1.1). Der Polychaet lebt im Sand in U-förmigen Wohnröhren an den deutschen Küsten sowie an fast allen Küsten des nördlichen Atlantiks, Pazifiks und des Mittelmeers. Die Tiere ernähren sich als Substratfresser, indem sie den am Trichter in den Gang hineinfallenden nährstoffreichen Sand aufnehmen und die darin enthaltenen organischen Partikel verdauen (Krüger 1971). Als Bewohner der Gezeitenzone ist der Wattwurm durch den Wechsel von Ebbe und Flut unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt. Bei Ebbe wird die Wohnröhre nicht mehr mit frischem Wasser durchspült, als Folge sinkt der

Sauerstoffgehalt ab (Watling 1991). Normale Respiration über die Atmungskette in den Mitochondrien ist dann nicht mehr möglich. Der Wattwurm besitzt jedoch für fakultative Anaerobier typische Enzyme wie z.B. die mitochondriale Fumarat-Reduktase, die Fumarat als alternativen Elektronenakzeptor zum Sauerstoff verwendet. Als typisches Endprodukt der Anaerobiose entsteht Succinat (Schroff und Schöttler 1977; Grieshaber *et al.* 1994; Tielens *et al.* 2002).



Abb. 1.1: **Der Wattwurm *Arenicola marina* L.** Der Rumpfabschnitt des Tieres hebt sich durch seine dunklere Färbung vom helleren Schwanzabschnitt ab, der auch keine Kiemen und Borsten trägt. Der Kopf des Wurmes ist hier schon zum Teil im Sand vergraben.

Sauerstoffmangel ist die eine Herausforderung für den Wattwurm, dazu kommen die vergleichsweise hohen Sulfidkonzentrationen, die in marinen Sedimenten vorherrschen. Das Sulfid ist hier mikrobieller Herkunft. In der oberen, nur wenige Millimeter dicken Schicht des marinen Sediments wird Sauerstoff, der aus der Atmosphäre in das Sediment diffundiert, sofort von heterotrophen, aeroben Bakterien verbraucht. Diese obere Schicht wird von der tieferen, sauerstoffarmen Schicht durch eine Sprungschicht (RPD-Schicht, redox potential discontinuity) getrennt (Fenchel und Riedl 1970). In den sauerstoffarmen Schichten leben Mikroorganismen, die organischen Detritus zu niedermolekularen Verbindungen wie Laktat oder Alkoholen fermentieren. Obligat anaerobe, sulfatreduzierende Bakterien, im wesentlichen *Desulfovibrio* und *Desulfomaculatum*, nutzen diese Verbindungen als Elektronenquelle. Hierbei dient Sulfat als finaler Elektronenakzeptor und wird zu Sulfid reduziert (Trüper 1984).

So konnten zum Teil Sulfidkonzentrationen von 3 μM bis zu 2 mM (Fenchel und Riedl 1970; Völkel und Grieshaber 1992; Völkel, Hauschild und Grieshaber 1995) oder sogar 8,1 mM (Lee, Kraus und Doeller 1996) im Wattboden gemessen werden. Doch bereits Konzentrationen zwischen 10 und 50 μM führen zu einer Hemmung von Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette (Bagarinao und Vetter 1990; Grieshaber und Völkel 1998) und die Tiere müssen entweder auf eine anaerobe Energiegewinnung ausweichen oder über einen Sulfidentgiftungsmechanismus verfügen.

1.3 Die Entgiftung von Sulfid

Völkel und Grieshaber (1994) konnten zeigen, dass unter normoxischen Bedingungen in Gegenwart von 1 mM Sulfid nach 8-stündiger Inkubation der Succinatgehalt in der Coelomflüssigkeit und im Gewebe von Wattwürmern ähnliche Werte wie unter Hypoxie erreicht. Daraus schlossen sie, dass Komplex IV durch Sulfid gehemmt war und Sauerstoff als Elektronenakzeptor nicht mehr zur Verfügung stand. Weiterhin konnten sie zeigen, dass die Succinatkonzentrationen nach Inkubation mit Sulfidkonzentrationen zwischen 390 und 760 μM kontinuierlich anstiegen, wohingegen bei Konzentrationen unter 330 μM Sulfid keine signifikante Zunahme von Succinat in der Coelomflüssigkeit und im Gewebe messbar war. Obwohl die äußere Sulfidkonzentration hier über 300 μM betrug, konnten Völkel und Grieshaber (1994) in der Coelomflüssigkeit der inkubierten Tiere nur bis zu 2 μM Sulfid nachweisen. Das deutete darauf hin, dass neben der sulfidinduzierten Anaerobiose auch entgiftende Mechanismen zum Tragen kommen müssen, denn bereits 1924 fand Beerman (1924) heraus, dass biologische Membranen permeabel für Sulfid sind.

Denkbar wären Mechanismen, die das Eindringen von Sulfid verhindern. Bei Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) konnte z.B. beobachtet werden, wie sie sich durch Schließen ihrer Schalen vor dem Eindringen von Sulfid schützen (Hergert 1998). Der Oligochaet *Tubificoides benedii* schützt sich, indem in der äußeren Mucusschicht Sulfid als Eisensulfid präzipitiert. Dubilier, Giere und Grieshaber (1995) konnten eine Schwarzfärbung der Würmer beobachten, wenn diese mit Sulfid inkubiert wurden.

Sulfid kann auch durch Epibakterien an der Körperoberfläche der Tiere abgefangen werden. Die Bakterien oxidieren Sulfid und nutzen es für den eigenen Energiestoffwechsel. Beobachtet wurde dies z.B. bei dem Priapuliden *Halicryptus spinulosus* (Oeschger und Schmaljohann 1988; Oeschger und Janssen 1991). Allein die äußere Abwehr dürfte aber bei vielen sulfidexponierten Arten nicht ausreichen, und auch für *Arenicola marina* wurden die oben aufgeführten Mechanismen nicht beschrieben.

Einige sulfidtolerante Tiere profitieren von Endosymbionten: Die chemotrophen Bakterien oxidieren Sulfid zu weniger toxischen Substanzen. Beschrieben wurde das z.B. für die Muschel *Solemya reidi* oder den oben bereits erwähnten Röhrenwurm *Riftia pachyptila* (Anderson, Childress und Favuzzi 1987; Childress *et al.* 1991). In letzterem wurde auch ein extrazelluläres Hämoglobin nachgewiesen, das – vermutlich über freie Cysteine – Sulfid zu binden vermag (Arp, Childress und Vetter 1987; Bailly *et al.* 2002).

Im Wattwurm scheint das Entgiftungsprodukt des Sulfids hauptsächlich Thiosulfat zu sein. 1992 konnten Völkel und Grieshaber erstmals Thiosulfat in der Coelomflüssigkeit von sulfidisch inkubierten Wattwürmern nachweisen. Thiosulfat ist – im Gegensatz zu Sulfid – nicht toxisch. Es hemmt die Cytochrom c Oxidase nicht (Vetter *et al.* 1989) und bindet nicht an Proteine (Cardozo und Edelman 1952).

1.4 Die Mitochondrien des Wattwurms *Arenicola marina* als Ort der Sulfidentgiftung

Völkel und Grieshaber (1994) konnten zeigen, dass die stöchiometrische Umsetzung von Sulfid zu Thiosulfat in den Mitochondrien des Wattwurms stattfindet und die Elektronen dabei auf Sauerstoff übertragen werden. Studien mit verschiedenen Inhibitoren sowie die Reduktion von extern zu einer Mitochondriensuspension gegebenem decyl-Ubichinon führten schließlich zu der Vermutung, dass ein der bakteriellen SQR ähnliches Enzym an der Sulfidoxidation beteiligt sein könnte (Völkel und Grieshaber 1996, 1997; Klein 1998; Leiers 1998). Bei Sulfidkonzentrationen, die 30 μM Sulfid nicht überschreiten, können die Elektronen des Sulfids zur ATP-Synthese verwendet werden (Völkel und Grieshaber 1997). Diese Form der Energiegewinnung, Chemolithoheterotrophie, ist überaus selten bei Mitochondrien und wurde 2001 erstmals für die ebenfalls in sulfidischen Habitaten lebende Gerippte Muschel *Geukensia demissa* von Doeller, Grieshaber und Kraus beschrieben. Bei höheren Sulfidkonzentrationen wird Sulfid zwar weiterhin unter Sauerstoffverbrauch zu Thiosulfat oxidiert, jedoch ohne Energiegewinn. Völkel und Grieshaber (1997) gingen davon aus, dass die Cytochrom c Oxidase des Wattwurms ähnlich sensitiv gegenüber Sulfid ist wie die nicht-sulfidadaptierter Organismen. Es wurde jedoch eine Cyanidresistente Atmung in Gegenwart von Sulfid beobachtet, die wiederum durch Salicylhydroxamsäure (SHAM) hemmbar war (Völkel und Grieshaber 1996, 1997). SHAM ist ein spezifischer Hemmstoff der bei Pflanzen, Pilzen und Protisten weit verbreiteten alternativen Oxidase (AOX). Das Enzym überträgt Elektronen auf Sauerstoff, ohne dabei Protonen zu pumpen (Vanleberghe und McIntosh 1997; Atteia *et al.* 2004). Unter der Annahme, dass bei *Arenicola marina* ein ähnliches Enzym beteiligt wäre, so könnte man eine Atmungskette in den

Mitochondrien des Wattwurmes wie in Abb. 1.2 dargestellt postulieren. Bis heute konnte kein AOX-Gen oder -Protein aus *Arenicola marina* oder einem anderen sulfid-adaptierten Invertebraten isoliert werden, jedoch wurden kürzlich tierische AOX-Sequenzen veröffentlicht, darunter z.B. das Gen der Pazifischen Auster *Crassostrea gigas* und des Nematoden *Meloidogyne hapla*, wobei ein Funktionsnachweis der kodierten Genprodukte noch aussteht (McDonald und Vanleberghe 2004).

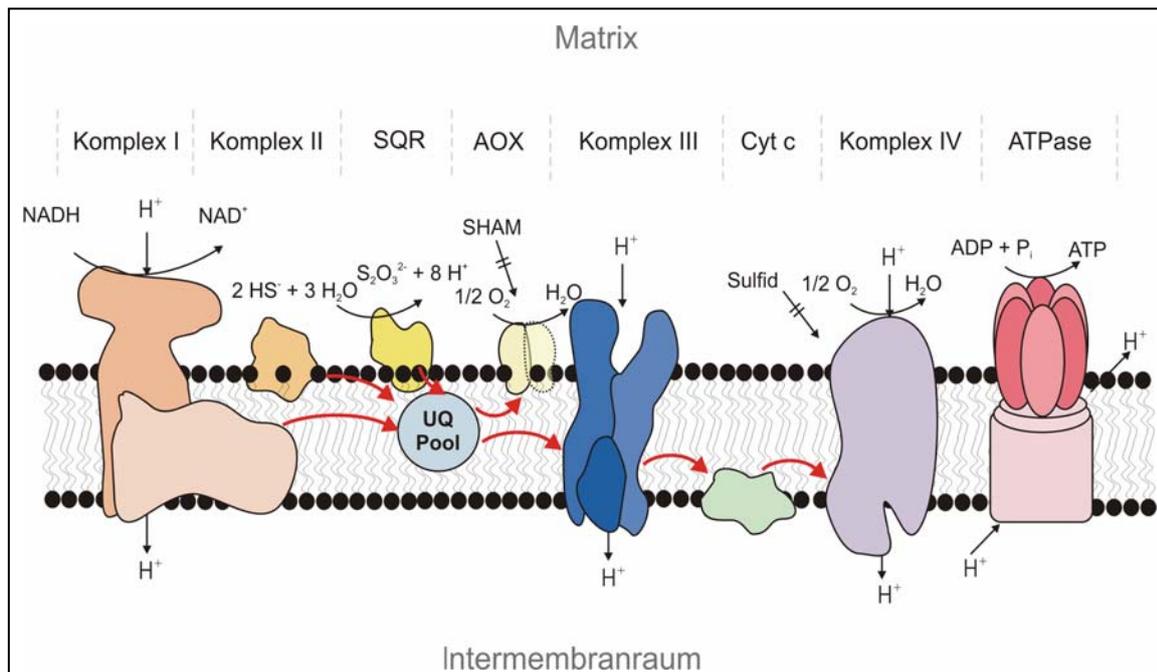


Abb.1.2: **Schema der mitochondrialen Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran von *Arenicola marina* und ihre Verknüpfung mit der Sulfidoxidation**, modifiziert nach Völkel und Grieshaber (1997). Sulfid wird von der Sulfid:Chinon Oxidoreduktase (SQR) zu Thiosulfat oxidiert. Die Elektronen des Sulfids werden auf Ubichinon übertragen und folgen dem weiteren Verlauf der Atmungskette. Bei geringeren Sulfidkonzentrationen wird Komplex IV nicht gehemmt und die Sulfidelektronen können zur ATP-Synthese genutzt werden. Bei höheren Sulfidkonzentrationen wird Komplex IV gehemmt und die Elektronen werden durch eine alternative Oxidase auf Sauerstoff übertragen. AOX: Alternative Oxidase; Cyt c: Cytochrom c; SHAM: Salicylhydroxamsäure; SQR: Sulfid:Chinon Oxidoreduktase; UQ: Ubichinon.

1.5 Die eukaryotische Sulfid:Chinon Oxidoreduktase

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die Mitochondrien des Wattwurms und auch die anderer sulfidtoleranter Arten Sulfid oxidieren können und bei niedrigen Konzentrationen die Elektronen aus Sulfid zur ATP-Synthese nutzen können. Es war bislang jedoch nicht gelungen, ein SQR-ähnliches Protein aus einem dieser Organismen zu reinigen, eine Gensequenz war ebenfalls nicht bekannt.

1999 konnten Vande Weghe und Ow zeigen, dass die Mitochondrien der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* in der Lage sind, Sulfid zu oxidieren. Sie beobachteten bei einer Cadmium-hypersensitiven Mutante die Akkumulation von Sulfid und konnten das für

diesen Defekt verantwortliche Gen (*hmt2*, h e a v y m e t a l h a n c e (*hmt2*, h e a v y m e t a l h a n c e) aus Wildtyphefen isolieren. Das in *E. coli* exprimierte und über einen His-Tag gereinigte Enzym oxidiert Sulfid und überträgt die Elektronen auf Coenzym Q₂, ein Ubichinon-Analogon. Durch Sequenzvergleiche konnten Vande Weghe und Ow zeigen, dass *hmt2* Homologien zu den bekannten prokaryotischen SQR-Sequenzen aus z.B. *Rhodobacter capsulatus* aufweist. Sie fanden auch Homologe in anderen eukaryotischen Genomen, wie z.B. Maus und Mensch. Das legte die Vermutung nahe, dass die SQR weiter verbreitet ist, als zunächst angenommen.

Die äußerst geringe Aktivität und Substrataffinität der SQR aus der Spaltheife im Vergleich mit ihren bakteriellen Homologen ließen jedoch Zweifel aufkommen, ob es sich tatsächlich um ein *in vivo* funktionelles Enzym handelt (Griesbeck *et al.* 2002). Die K_m-Werte sowohl für Ubichinon als auch für Sulfid lagen mit 2 mM 1000-fach höher als die entsprechenden Werte für bakterielle SQRs. Nichtsdestotrotz ließ jene Evidenz für das Vorkommen einer eukaryotischen Sulfidoxidation in Mitochondrien aus nicht-sulfidadaptierten Tieren ältere Arbeiten im neuen Licht erscheinen. Erstmals wurde diese Fähigkeit 1972 bei Rattenmitochondrien entdeckt (Curtis *et al.* 1972; Bartholomew *et al.* 1980). Auch Fische scheinen in der Lage zu sein, in ihren Mitochondrien Sulfid zu oxidieren (Bagarinao und Vetter 1990), und in Hühnermitochondrien wurde sogar eine Kopplung der Sulfidoxidation mit der ATP-Synthese nachgewiesen (Yong und Searcy 2001).

Diese Befunde gingen mit der Beobachtung einher, dass relativ hohe Sulfidkonzentrationen in den Gehirnen von Ratten, Menschen und Rindern gemessen werden konnten (Goodwin *et al.* 1989; Warenycia *et al.* 1989; Savage und Gould 1990). Es wurde dabei vermutet, dass Sulfid eine physiologische Rolle spielen könnte, doch erst seit 2001 findet Sulfid als atypischer Neuromodulator neben den Gasen NO und CO große Beachtung (Baranano, Ferris und Snyder 2001). Mittlerweile sind die Enzyme bekannt, die für die endogene Sulfidproduktion in Säugern verantwortlich sind (zusammengefasst in Kamoun 2004). Auch die anaeroben Bakterien, die im menschlichen Darm Sulfat reduzieren, produzieren dabei beachtliche Mengen Sulfid, die bereits im toxischen Bereich liegen (MacFarlane, Gibson und Cummings 1992). Enzyme, die Sulfid entgiften können, scheinen somit nicht nur für Tiere, die exogen Sulfid aufnehmen, essentiell zu sein.

1.6 Die Bedeutung von Sulfid in der Erdgeschichte

Das Vorkommen von Sulfid und sulfidverarbeitenden Enzymen wie der SQR bei den Eukaryoten mag zunächst überraschen, doch in Hinblick auf die mittlere Erdgeschichte ist es eigentlich zu erwarten wenn nicht zwingend zu fordern:

Heute ist nämlich bekannt, dass vor etwa 2 bis 0,6 Milliarden Jahren die biologische Sulfatreduktion, bei der Sulfid produziert wird, sehr aktiv und verbreitet war (Canfield 1998; Shen, Buick und Canfield 2001; Anbar und Knoll 2002). Demnach müssen die tieferen Gewässer der Erdozeane in dieser Zeit anoxisch und sulfidisch gewesen sein. Primitive, einzellige Eukaryoten sind mindestens 1,5 Billionen Jahre alt (Javaux, Knoll und Walter 2001), so dass die Differenzierung der Eukaryoten in einer anoxischen und sulfidischen Atmosphäre stattgefunden haben muss. Somit wäre die SQR ein überlebenswichtiges Enzym für die ersten Eukaryoten gewesen, das bis heute erhalten geblieben ist. Ähnliches gilt für viele mitochondriale Enzyme des anaeroben Stoffwechsels, wie z.B. die Fumarat Reduktase (FRD), Acetat:Succinat CoA-Transferase (ASCT) oder Pyruvat:NADP⁺ Oxidoreduktase (PNO), die eubakteriellen Ursprungs sind (Tielens *et al.* 2002).

1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel, zunächst das *sqr*-Gen aus *Arenicola marina* zu isolieren, denn eine Gensequenz für die SQR aus einem sulfidadaptierten Tier war noch nicht bekannt. Durch heterologe Expression sollten ausreichende Mengen des Proteins produziert und gereinigt werden, die eine biochemische Charakterisierung ermöglichen. Die Substrataffinitäten und die Endprodukte der Reaktion sollten ermittelt werden, außerdem war die Frage zu klären, ob und welche Kosubstrate das Enzym benötigt. Die gerichtete Mutation konservierter Aminosäuren sollte Einblicke in den Reaktionsmechanismus ermöglichen. Schließlich sollte die Verbreitung der SQR bei den Eukaryoten untersucht werden, und durch phylogenetische Analysen die stammesgeschichtliche Herkunft des eukaryotischen Enzyms geklärt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen J.T. Baker, Biomol, Bio-Rad, Biozym, Calbiochem, Difco, Fluka, GibcoBRL, ICN, Merck, Riedel-de Haën, Roche, Roth, Serva und Sigma mindestens in Analysequalität (p.a.) geliefert. Radiochemikalien wurden von der Firma Hartmann Analytic bezogen.

2.2 Reagenzsätze

First strand synthesis Kit for RT-PCR	Invitrogen
Gigapack III Gold	Stratagene
Lambda ZAP II Predigested EcoRI/CIAP-Treated Vector Kit	Stratagene
mRNA Purification Kit	GE Healthcare Biosciences
Nucleospin Plasmid Kit (Mini, Midi, Maxi)	Macherey-Nagel
Nucleospin RNA II Kit	Macherey-Nagel
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Spektroquant Sulfid-Test	Merck
ThermaSequenase DYEnamic direct cycle sequencing Kit	GE Healthcare Biosciences
Time Saver cDNA Synthesis Kit	GE Healthcare Biosciences

2.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
DNase I	Roche
Klenow Fragment	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega
<i>Pfu</i> Ultra DNA Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, New England Biolabs
Rhodanase (aus Rind)	Sigma
RNase A	Serva
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Eppendorf
Thioredoxin (aus <i>E. coli</i>)	Promega

Thioredoxin-Reduktase (aus <i>E. coli</i>)	Sigma
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas

2.4 Organismen

2.4.1 *Arenicola marina*

Tiere der Art *Arenicola marina* L. wurden an der niederländischen Küste gesammelt. Vor Ort wurden Kopf und Schwanz der Tiere abgetrennt, der Hautmuskelschlauch von den inneren Organen befreit und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Hautmuskelschlauchstücke wurden bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C aufbewahrt.

2.4.2 *Drosophila melanogaster*

Für die RNA-Isolierung aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurden freundlicherweise Tiere aus dem Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

2.4.3 *Escherichia coli*

Folgende Stämme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

XL1- Blue MRF ⁺ (Stratagene)	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^{\text{r}}\text{)]}$
SOLR (Stratagene)	$\text{e14}^-(\text{McrA-})\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})171 \text{ sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5 (Kan}^{\text{r}}\text{) lac gyrA96 relA1 thi1 endA1 } \lambda\text{R[F'proAB lacIqZ}\Delta\text{M15] Su-}$
BL21 (DE3) (Invitrogen)	$\text{F}^- \text{ ompT hsdS}_B (\text{r}_B^- \text{m}_B^-) \text{ gal dcm(DE3)}$
C41 (DE3) (Avidis)	$\text{B F dcm ompT hsdS}(\text{r}_B \text{m}_B) \text{ Gal } \lambda \text{ (DE3) + 1 nicht charakterisierte Mutation}$
C43 (DE3) (Avidis)	$\text{B F dcm ompT hsdS}(\text{r}_B \text{m}_B) \text{ Gal } \lambda \text{ (DE3) + 2 nicht charakterisierte Mutationen}$
Origami (DE3) (Novagen)	$\Delta\text{ara-leu 7697 } \Delta\text{lacX74 } \Delta\text{phoAPvull phoR araD139 galE galK rpsLF}^+ [\text{lac}^+ (\text{lac}^{\text{q}})\text{pro}] \text{ gor522::Tn10(Tc}^{\text{R}}\text{) trxB::kan (DE3)}$
Rosetta (DE3) (Novagen)	$\text{F}^- \text{ ompT hsdSB}(\text{r}_B^- \text{m}_B^-) \text{ gal dcm (DE3) pRA RA (argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL)}$

Material und Methoden

T7proext	5`-IRD700-CGC GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG-3`	Tm=61,9 °C
T7term	5`-IRD800-ATG CTA GTT ATT GCT CAG CGG-3`	Tm= 57,9 °C
T7Promotor	5`-IRD700-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3`	Tm=53,2 °C
CYC1reverse	5`-IRD800-GCG TGA ATG TAA GCG TGA C-3`	Tm=56,7 °C

Für die Amplifikation von Hybridisierungssonden wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Drosoforw	5`-ATG AAC CGT CGC CTT CCA GGA ACC-3`	Tm=66,1 °C
Drosorev	5`-GCA CTG AGA AAA TTT TCC GCA TTA GTG CC-3`	Tm=65,3 °C
Amarfor	5`-TCG TGG ATT TTG GGT GTC C-3`	Tm=56,7 °C
Amarre	5`-CGG TGA CAG CTT CCA TGG-3`	Tm=58,2 °C

Für die Sequenzierung der positiven SQR-Klone durch „Primer Walking“ wurden folgende Oligonukleotidpaare gewählt:

clonA22-700	5`-CTT TCC ACC CGT CCA GCG-3`	Tm=60,5 °C
clonA22-800	5`-GCC ATG GAA GCT GTC ACC G-3`	Tm=61,0 °C
22m-700	5`-GGC CAT GCC CTT GGG TAT GAG-3`	Tm=63,7 °C
22m-800	5`-ACG GCC TGA CAT TAC CGG GAT AC-3`	Tm=64,2 °C
23-700	5`-GAC GGC CAG CCC TCG AAG ACC-3`	Tm=67,6 °C
23-800	5`-ACC CGT CCA GCG AAT TCA CTA CTG G-3`	Tm=66,3 °C
23-2-700	5`-CGA AAA CAA TGG CTT TAT GTC-3`	Tm=54,0 °C
23-2-800	5`-CAC AGA CGA CTT GAT GCA TAC-3`	Tm=57,9 °C
25-700	5`-CCA GAC AAC AAC ACC GTC TTC-3`	Tm=59,8 °C
25-800	5`-GCA CGC AAG CAG ATA TAA CTC AAC-3`	Tm=61,0 °C
25-2-700	5`-CTG TGA TCA TGG CGG AG-3`	Tm=55,2 °C
25-2-800	5`-TCT TCT TCT TAC CGT ACA GTG AAC-3`	Tm=59,3 °C

Für die Klonierung in Expressionsvektoren wurden Oligonukleotide mit Restriktionschnittstellen synthetisiert, die somit eine gerichtete Klonierung erlaubten:

SQR- BamHI	5'-GTT GGT <u>GGA TCC</u> ATG GCC TCA CGC AAG GTT TC-3' <i>BamHI</i>	Tm= 72,1 °C
SQR- HindIII	5'-GGT GGT <u>AAG CTT</u> CTA CCG ACT CAT ACC CAA GGG-3' <i>HindIII</i>	Tm= 71,9 °C
SQR- BamHI	5'-ATT <u>GGA TCC</u> ATG ATC GAG CCG GCC GAC ACC-3' <i>BamHI</i>	Tm= 72,2 °C
kurz		
SQR- BsmBI	5'-GGT GGT <u>CGT CTC</u> ACA TGG CCT CAC GCA AGG TTT CCC-3' <i>BsmBI</i>	Tm= 81,2 °C
SQR- NotI	5'-GAT GTT <u>GCG GCC GCC</u> CGA CTC ATA CCC AAG TGC ATT GC-3' <i>NotI</i>	Tm= 82,1 °C
SQR- HindIII	5'-GGT GGT <u>AAG CTT</u> ATG GCC TCA CGC AAG GTT TCC-3' <i>HindIII</i>	Tm= 72,1 °C
SQR- XbaI	5'-GGT GGT <u>TCT AGA</u> CCG ACT CAT ACC CAA GTG CAT TGC-3' <i>XbaI</i>	Tm=72,7 °C

Für die gerichtete Mutagenese von 6 Aminosäuren wurden die nachfolgend aufgeführten Oligonukleotidpaare verwendet. Gegenüber der Wildtypsequenz veränderte Nukleotide sind unterstrichen.

Asp342Val	5'-GTC TTC GGC ATC GGT <u>GTC</u> AAC ACG GAT ATA CCG-3' 3'-CAG AAG CCG TAG CCA <u>CAG</u> TTG TGC CTA TAT GGC-5'	Tm=76,4 °C
Cys208Ser	5'-GCC CAT CAA <u>ATC</u> TGC <u>AGG</u> CGC GCC GC-3' 3'-CG GGT AGT TTA <u>GAC</u> <u>GTC</u> CGC GCG GCG-5'	Tm=72,7 °C
Cys386Ser	5'-CGG CTA CAC GTC <u>TTC</u> CCC CCT GGT GAC G-3' 3'-G CCG ATG TGC <u>AGA</u> <u>AGG</u> GGG GAC CAC TGC-5'	Tm=73,9 °C
His86Ala	5'-GCC GAC <u>ACG</u> <u>GCC</u> TAC TAT CAG-3' 3'-CGG CTG <u>TGC</u> <u>CGG</u> ATG ATA GTC-5'	Tm=63,7 °C

His299Ala 5`-GCC ATG CTG GCC GTG GTG CCT-3`
3`-CGG TAC GAC CGG CAC CAC GGA-5` T_m=67,6 °C

Glu159Ala 5`-GGG CTG CCT GCA GCC TTC-3`
3`-CCC GAC GGA CGT CGG AAG-5` T_m=62,8 °C

2.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren erfolgten nach Standardprotokollen nach Sambrook *et al.* (1989) und werden hier nicht ausführlich beschrieben:

- Phenolextraktion und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen durch Ethanol- oder Isopropanolextraktion
- Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Trennung von Nukleinsäuren oder DNA-Fragmenten und deren Größenbestimmung durch Agarosegelelektrophorese
- Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen
- Ligationen von DNA-Fragmenten mit Vektoren mit Hilfe der T4-DNA-Ligase
- Dephosphorylierung von Vektoren mit der alkalischen Phosphatase
- Ausplattierung von cDNA-Banken

2.7.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Arenicola marina*

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden zunächst 10 g gefrorenes Hautmuskelschlauchgewebe unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Das Pulver wurde mit 100 ml Aufnahme-puffer (50 mM Tris/HCl, pH 9,0; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 30 mM 2-Mercaptoethanol; 2 % (w/v) SDS; 4 M Guanidiniumthiocyanat; 5 % (w/v) Polyklar; Proteinase K) versetzt und die Mischung einige Minuten geschüttelt. Es wurden 100 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben und erneut 2-3 min geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch eine Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm (20 °C, Rotor SLA-1500, Sorvall RC 5B Plus). Die wässrige Phase wurde abgenommen und erneut phenolisiert. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 6,5 und 1 Volumen Isopropanol für 1 h bei -20 °C. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 10000 rpm und 4 °C (Rotor SLA-1500, Sorvall RC 5B Plus). Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend in 10 ml TE mit 100 µg Proteinase K und 30 mM Mercaptoethanol gelöst. Die Fällung der RNA erfolgte über Nacht bei

0 °C mit 2,5 ml 10 mM LiCl. Durch Zentrifugation bei 10000 rpm für 30 min (4 °C, SS 34, Sorvall RC 5B Plus) wurde die RNA pelletiert, das Pellet mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA in 1,5 ml TE mit 15 µg Proteinase K und 30 mM 2-Mercaptoethanol aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.7.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Drosophila melanogaster* und anschließende cDNA-Synthese

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *Drosophila melanogaster* wurde das Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Etwa 30 gefrorene Fliegen wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert und das Pulver nach Herstellerangaben weiterverarbeitet. Die RNA wurde in 60 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Es wurde cDNA nach Herstellerangaben mit Hilfe des „First strand Synthesis Kit for RT-PCR“ (Invitrogen) synthetisiert. Hierzu wurden 1,3 µg der Gesamt-RNA eingesetzt. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.7.3 Reinigung von poly(A)⁺ - RNA aus Gesamt-RNA von *Arenicola marina*

Die Reinigung von poly(A)⁺-RNA (mRNA) aus Gesamt-RNA des Wattwurms *Arenicola marina* erfolgte mit Hilfe des „mRNA Purification Kits“ (GE Healthcare Biosciences) nach Herstellerangaben. Es wurden 1,25 mg Gesamt-RNA eingesetzt und das mRNA-Pellet in 75 µl TE aufgenommen.

2.7.4 Herstellung einer cDNA-Bank aus *Arenicola marina*

Die cDNA-Synthese erfolgte nach der RNase H Methode aus poly(A)⁺ RNA (siehe 2.7.3) unter Verwendung des „Time Saver cDNA Synthesis Kits“ (GE Healthcare Biosciences) nach Herstellerangaben. Es wurden 5 µg mRNA zur Erststrangsynthese eingesetzt. Hierbei wurden Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Oligonukleotide und eine Reverse Transkriptase aus dem Moloney Murine Leukemia Virus verwendet. Die Zweitstrangsynthese erfolgte mit Hilfe von RNase H und DNA Polymerase I. Die synthetisierte cDNA wurde einer Phenol/Chloroform Extraktion unterzogen und über eine Sepharose CL-4B Säule gereinigt. Es folgte eine Ligation von *EcoRI/NotI* Adaptoren an die cDNA. Die Adaptoren bestehen aus zwei Oligonukleotiden, die eine Heteroduplex bilden, so dass ein phosphoryliertes glattes Ende, ein nicht phosphorylierter *EcoRI* Überhang und eine interne *NotI* Schnittstelle entstehen. Die *EcoRI* Enden wurden phosphoryliert und überschüssige dimerisierte Adaptoren über eine CL-4B Säule entfernt. Die cDNA wurde in den mit *EcoRI* geschnittenen und dephosphory-

lierten Vektor Lambda ZAP II (Stratagene) ligiert. Nach der Ligation erfolgte die Verpackung mit Hilfe des Gigapack III Gold Verpackungsextrakts der Firma Stratagene. Der Titer und die Insertionsrate der erhaltenen cDNA-Bank wurden bestimmt und die Bank amplifiziert. Nach erneuter Titerbestimmung wurde die cDNA Bank zur Identifizierung von rekombinanten Klonen eingesetzt. Für die Hybridisierung mit einer homologen Sonde wurde eine weitere cDNA-Bank angelegt, die nicht amplifiziert wurde.

2.7.5 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung von Sonden für die Plaque-Hybridisierung erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989). Die DNA wurde denaturiert und anschließend mit 1x Oligo-Mix (5 OD₂₆₀ p(dN)₆ (GE Healthcare Biosciences); 10 mM MgCl₂; 50 mM Tris-HCl, pH 7,0; je 50 µM dATP, dGTP, dTTP; 7 mM 2-Mercaptoethanol) 5 µg BSA, 2,5 U Klenow-Fragment und 3 µl einer α³²PdCTP-Suspension (1,1 MBq) für 2-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden anschließend über eine Sephadex G50-Säule entfernt und die Sonde sofort für die Hybridisierung eingesetzt.

2.7.6 Identifizierung rekombinanter Klone

Für die Herstellung von Nitrozellulose-Replikafiltern und die Plaque-Hybridisierung wurden Standardprotokolle verwendet (Sambrook *et al.* 1989). Es wurden etwa 25000 Klone der cDNA-Bank (siehe 2.9.3) mit *E. coli* XL1-Blue auf 40 Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden von diesen Platten Replikafilter (Porablot Nitrozellulose Rundfilter, Macherey-Nagel) erstellt. Bei Verwendung einer heterologen Sonde aus *Drosophila melanogaster* wurden die Filter für 3 Stunden bei 55 °C in 6x SSPE (900 mM NaCl; 60 mM NaH₂PO₄; 7,5 mM EDTA, pH 8,0) mit 0,1 % (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) PVP, 0,02 % (w/v) Ficoll 400 und 1/1000 Volumen PolyA (50 µg/µl, GE Healthcare Biosciences) vorhybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 55 °C in 3x SSPE mit 0,1 % (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) PVP, 0,02 % (w/v) Ficoll 400 und 1/1000 Volumen PolyA sowie 1,5 µg Hybridisierungssonde. Gewaschen wurde für 2x 15 min in 3x SSPE mit 0,1 % (w/v) SDS. Bei Verwendung einer homologen Sonde aus *Arenicola marina* wurde bei 68 °C vorhybridisiert, hybridisiert und 3 x gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Filter getrocknet und auf XAR-Filmen (Kodak) über Nacht bei -80 °C mit Verstärkerfolie exponiert. Plaques, die ein positives Signal zeigten, wurden mit dem stumpfen Ende einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen und für mindestens 1 h bei RT in SM-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 8 mM MgSO₄; 0,01 % (w/v) Gelatine)

inkubiert. Zur Vereinzelnung wurde eine geeignete Verdünnung dieser Phagensuspension ausplattiert und nach der Herstellung von Replikafilern mit der gleichen Sonde wie zuvor hybridisiert.

2.7.7 *In vivo* Ausschleusung von Einzelklonen einer cDNA-Bank

Die Ausschleusung von Einzelklonen erfolgte nach Herstellerangaben des „Lambda ZAP II Predigested *Eco*RI/CIAP-Treated Vector Kits“ (Stratagene). Ein einzelner positiver Plaque wurde ausgestochen und 3 h bei Raumtemperatur in 500 µl SM-Puffer mit 25 µl Chloroform inkubiert. Ein 250 µl-Aliquot wurde mit *E. coli* XL1-Blue-MRF'-Zellen und 1 µl des ExAssist Helferphagen (Stratagene) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Durch Lyse der Bakterien wurden pBluescript-Phagemide in f1-Phagenpartikeln freigesetzt und konnten von *E. coli* SOLR-Zellen aufgenommen werden.

2.7.8 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des Nucleospin Plasmid Kit (Mini, Midi, Maxi; Macherey-Nagel). Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt. Mit passenden Enzymen wurde eine Restriktionsspaltung durchgeführt und der Ansatz anschließend zur Größenüberprüfung der Insertion auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.7.9 Sequenzierung nach Sanger

Mit Ausnahme der Mutationsklone, die von der Firma AGOWA (Berlin) sequenziert wurden, erfolgte die Sequenzierung nach der Didesoxymethode von Sanger *et al.* (1977). Es wurde eine Laserfluoreszenz-Sequenzierung mit Hilfe eines DNA Sequencer Long ReadIR 4200 (Licor) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden 2-3 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 20 µl H₂O eingesetzt. Die Sequenzierreaktionen wurden mit Hilfe des „ThermoSequenase DYEnamic direct cycle sequencing Kits“ (GE Healthcare Biosciences) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Primus 96 Plus Thermocycler der Firma MWG Biotech. Nach einmaliger Denaturierung bei 98 °C für 2,5 min wurde ein PCR-Programm mit 25 Zyklen mit 1 min bei 98 °C (Denaturierung), 35 s bei 68,5 °C (Hybridisierung) und 2 min bei 71 °C (Synthese) durchgeführt. Nach Abschluss der PCR wurden die Proben mit 7 µl Formamid-Ladepuffer (200 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0; 100 ml Paraosanilin 100 mg/ml; 9,5 ml Formamid) versetzt und für 3 min bei 70 °C denaturiert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und jeweils 1,5 µl jeder Reaktion

auf ein Sequenzgel aufgetragen. Die Zusammensetzung und der Aufbau des Gels erfolgten nach Herstellerangaben.

2.7.10 Polymerase-Kettenreaktion

Sofern nicht anders angegeben, wurde ein PCR-Ansatz in einem Volumen von 25 oder 50 μl durchgeführt. Dieser Ansatz enthielt einen Polymerase-spezifischen Puffer in einfacher Konzentration, 0,2 mM je dNTP, 1 μM je Primer und 1 U *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase. Es wurden 10-100 ng Plasmid-DNA, cDNA oder eine Bakterienkolonie als Matrize eingesetzt. In einem Thermocycler der Firma MWG wurden nach einer anfänglichen Denaturierung von 2 min bei 95 °C 25-30 Zyklen von 30 s bei 95 °C, 30 s bei 3-8 °C unter der jeweiligen Schmelztemperatur der eingesetzten Primer und 45 s bis 2,5 min bei 72 °C programmiert. Es folgten weitere 5 min bei 72 °C. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz auf einem Agarosegel analysiert.

2.7.11 Klonierung von PCR-Fragmenten

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten wurden diese zunächst auf einem Agarosegel aufgetrennt und die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution des DNA-Fragments erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen). Es folgte eine Ligation in die Vektoren TOPO-TA (Invitrogen) oder pGEM-T Easy (Promega) nach Herstellerangaben.

2.8 Arbeiten mit *Escherichia coli*

Die folgenden Arbeiten mit *E. coli* Stämmen wurden nach Standardprotokollen nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt:

- Herstellung der Kulturmedien LB, LB mit 1 M Sorbitol und 2,5 mM Betain sowie YPD
- Anzucht der Bakterien auf Fest- und in Flüssigmedien
- Herstellung von CaCl_2 -kompetenten *E. coli* Zellen
- Transformation von CaCl_2 -kompetenten Zellen durch Hitzeschock mit Plasmid-DNA
- Transfektion von *E. coli* Zellen mit λ -Phagen und die Vermehrung der λ -Phagen
- Überprüfung rekombinanter Plasmid-DNA durch Blau-Weiss-Selektion

2.8.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*- Zellen

200 ml einer *E. coli* XL1-Blue-Kultur wurden nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 4000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus). Das Pellet wurde viermal mit 25 ml eiskaltem H₂O gewaschen und wie oben zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 400 µl 10 % (v/v) Glycerin (eiskalt) gelöst und in Aliquots bei -80 °C eingefroren.

2.8.2 Elektroporation von *E. coli*- Zellen

In eisgekühlte 2 mm Elektroporationsküvetten (Bio-Rad) wurden 30 µl elektrokompetente Zellen mit Plasmid DNA vermischt. Es wurde ein Impuls von 2,5 kV für 5 s gegeben (Gene Pulser XCell, Bio-Rad) und sofort 1 ml warmes LB-Medium zu den Zellen pipettiert. Die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert und anschließend auf Selektivmedium ausplattiert.

2.8.3 *E. coli*- Expressionskulturen

Es wurden verschiedene Bedingungen getestet, um eine erfolgreiche Expression der SQR in *E. coli* zu erreichen:

Das umfasste Variationen der Inkubationstemperatur (16 °C, 30 °C und 37 °C), der Dauer der Induktion (1 h bis ÜN), der Konzentration des Induktors IPTG (0,01 mM - 1 mM) sowie der verwendeten Stämme (BL21(DE3), C41(DE3), C43(DE3), Rosetta(DE3) und Origami(DE3)) und Vektoren (pET-24d, pET-28a und pET-32a). Es wurden sowohl LB, LB mit 1 M Sorbitol und 2,5 mM Betain als auch YPD-Medium eingesetzt. Es wurde sowohl der komplette SQR-kodierende Bereich exprimiert, als auch ein Teil der Sequenz, der das vorhergesagte Transitpeptid von 80 Aminosäuren nicht enthielt.

2.8.4 Aufschluss von *E. coli*- Expressionskulturen

Bei einem typischen Aufschluss einer *E. coli*- Expressionskultur (siehe 2.8.3) wurden die Zellen zunächst für 10 min bei 4000 rpm und 4 °C pelletiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus). Das Pellet wurde in Lysis-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) aufgenommen. Es wurden 1 mg/ml Lysozym hinzugegeben und die Probe 30 min auf Eis inkubiert. Der Aufschluss erfolgte auf Eis durch Ultraschall in 6 Intervallen von je 10 s und je 10 s Pause bei 50 % Intensität. Anschließend wurden die Proben mit RNase A (10 µg/ml) und DNase I (5 µg/ml) versetzt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C für 30 min (Biofuge Fresco,

Heraeus) abgetrennt und der Überstand für die Aktivitätsbestimmung und Analyse durch SDS-PAGE, das Pellet nur für die Analyse durch SDS-PAGE, aufgehoben.

Alternativ zu diesem Aufschluss wurden andere Methoden angewandt. Es wurden Lysis-Puffer mit einem pH von 6,5 sowie 9,0 verwendet, und es wurden die Detergenzien Natrium-Cholat (1,2 % (v/v)), Thesit (0,2 % (v/v)) oder Triton X-100 (0,5 % (v/v)) zugesetzt. Als Aufschlusspuffer wurde außerdem das Reagenz BugBuster der Firma Novagen eingesetzt, und die Zellen anstelle von Ultraschall mit einer French Pressure Cell aufgeschlossen.

2.9 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

2.9.1 Hefe-Medien

A. YPD-Vollmedium (Yeast Extract Peptone Dextrose-Medium)

1 % (w/v) Hefeextrakt

2 % (w/v) Pepton

2 % (w/v) D-Glukose

B. SC-Minimalmedium (Selektivmedium)

0,67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Sigma)

2 % (w/v) Glukose *oder* zur Induktion 1 % (w/v) Raffinose und 2 % (w/v) Galaktose

Eine synthetische Aminosäuremischung (Yeast Synthetic Dropout mix w/o uracil, Sigma) mit folgender Zusammensetzung:

0,01 % (Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin, Tryptophan)

0,005 % (Asparaginsäure, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin)

2.9.2 Herstellung kompetenter Hefezellen

5 ml Vorkulturen wurden in YPD-Medium ÜN bei 30 °C und 200 rpm inkubiert und am nächsten Morgen 40 ml YPD mit der Vorkultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 30 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in ein steriles Zentrifugengefäß überführt und die Zellen bei 3000 rpm für 5 min in einer Megafuge 1.0 R (Heraeus) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml Puffer 1 (0,6 M KCl; 10 mM Bicin, pH 8,35; 3 % (w/v) Ethylenglykol) resuspendiert, und Aliquots von 200 µl wurden bei -80 °C eingefroren.

2.9.3 Hefetransformation

50 µg Träger-DNA (DNA aus Heringssperma, Roche) wurden für 10 min bei 95 °C denaturiert. Auf die noch gefrorenen kompetenten Zellen (siehe 2.11.2) wurde zunächst die Träger-DNA, dann 1-4 µg Plasmid-DNA gegeben und die Zellen anschließend für 60 s bei 37 °C in einem Schüttelthermostat (Thermomixer compact, Eppendorf) bei 300 rpm inkubiert. Es wurden 15 µl 100 mM CaCl₂ hinzugegeben und die Mischung für weitere 3 min geschüttelt. Dann wurden 75 µl 100 mM CaCl₂ und 1 ml Puffer 2 (40 % (w/v) PEG 1000; 200 mM Bicin, pH 8,35) hinzugegeben und das Reaktionsgefäß 2-3 mal vorsichtig gewendet. Es folgte eine einstündige Inkubation ohne Schütteln bei 30 °C. Anschließend wurden die Zellen für 1 min bei 3000 rpm in einer Tischzentrifuge (Biofuge Fresco, Heraeus) pelletiert, mit 500 µl Puffer 3 (150 mM NaCl; 10 mM Bicin, pH 8,35) gewaschen und in 200 µl Puffer 3 resuspendiert. Die Zellen wurden auf Selektivmedium ausplattiert und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.9.4 Hefe-Expressionskulturen

Die SQR aus *Arenicola marina* wurde in der Hefe heterolog exprimiert. Für eine Reinigung des exprimierten Proteins aus 4 Litern wurden zunächst 50 ml SC-Minimalmedium mit Glukose mit einer Kolonie angeimpft und diese für 2 Tage bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 200 ml SC-Minimalmedium mit Raffinose/Galaktose zu einer OD₆₀₀ von 0,4 angeimpft. Hierzu wurde das entsprechende Volumen der Vorkultur bei 2700 rpm (Megafuge 1.0 R, Heraeus) und RT pelletiert und in wenig SC-Medium mit Raffinose/Galaktose resuspendiert. Durch die im Medium enthaltene Galaktose wurde die Expression eingeleitet. Die Kultur wurde ÜN bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Von dieser Kultur wurden 4 Liter SC-Medium mit Raffinose/Galaktose zu einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und erneut ÜN bei 200 rpm und 30 °C inkubiert.

2.9.5 Isolierung von Hefemitochondrien

Da die SQR des Wattwurms ein mitochondriales Enzym ist, sollte es in der Hefe ebenfalls in den Mitochondrien akkumuliert werden. Daher bestand der erste Reinigungsschritt aus der Isolierung dieser Organellen. Hierzu wurden die Zellen aus 4 Litern Expressionskultur bei 3000 rpm und RT für 5 min pelletiert (SLA 3000, Sorvall RC 5B Plus). Das Pellet wurde mit 100 ml H₂O gewaschen und wie oben zentrifugiert. Dann wurden die Zellen erneut mit 100 ml Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 50 mM NaCl; 0,6 M Sorbitol) gewaschen und zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde in 60 ml Waschpuffer re-

suspendiert und mit 1 µl/ml Yeast/Fungal Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) versetzt. Die Zellsuspension wurde auf sechs 50 ml Sarstedt-Gefäße verteilt und jeweils ½ Volumen Glasperlen (Ø 0,4 – 0,6 mm, säuregewaschen) hinzugegeben. Nach einer Inkubation auf Eis für 5 min wurden die Zellen durch 4x vortexen (Reax Top, Heidolph) bei Maximalgeschwindigkeit und 4 °C für 1 min aufgeschlossen. Zwischen den einzelnen Vortexschritten wurden die Zellen für jeweils 1 min auf Eis belassen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus), um Zelltrümmer und Glasperlen abzutrennen. Der Überstand wurde in ein 30 ml Zentrifugengefäß (Nalgene) überführt und bei 9000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert (SS 34, Sorvall RC 5B Plus). Der Überstand (PMS = Post mitochondrial supernatant) wurde verworfen und das Pellet (= Mitochondrien) in 30 ml Waschpuffer mit 1 µl/ml Protease Inhibitor Cocktail resuspendiert.

2.9.6 Isolierung der Hefemitochondrienmembranen

Die Mitochondrien wurden zunächst durch Ultraschallbehandlung (Sonoplus HD 60, Bandelin) aufgeschlossen. Es wurden 5 x 10 Impulse mit einer Intensität von 50 % gegeben. Die Probe wurde währenddessen auf Eis gekühlt und zwischen den Impulseinheiten für 10 s auf Eis belassen. Darauf folgte eine Ultrazentrifugation bei 30000 rpm und 4 °C für 1 h (T-865, Sorvall Ultra Pro 80). Der Überstand (= lösliche Mitochondrienproteine) wurde verworfen und das Membranpellet in 5 ml Solubilisierungspuffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7,2; 5 % (v/v) Glycerin; 320 mM NaCl; 0,5 % (v/v) Triton X-100; 20 mM Imidazol) und 1 µl/ml Protease Inhibitor Cocktail resuspendiert.

2.10 Reinigung der SQR/His aus der Hefemitochondrienmembran

Um membrangebundene SQR für die NiNTA-Matrix zu solubilisieren, wurde sie zunächst durch Rühren für 1 h auf Eis durch das im Puffer enthaltene Detergenz Triton X-100 von der Membran gelöst. Dieser Schritt ist besonders kritisch, denn solange das Protein noch in oder an der Membran gebunden vorliegt, ist es am besten stabilisiert und auch vor Angriffen durch Proteasen geschützt (von Jagow, Link und Schägger 1994). Bei der Arbeit mit Hefe war es zwingend erforderlich, Protease Inhibitoren zuzugeben, um das exprimierte Protein vor Abbau zu schützen. Die Bäckerhefe besitzt eine Vielzahl verschiedener Proteasen in sämtlichen Kompartimenten, einschließlich der Mitochondrien (Jones 1991).

Dann erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung mit Hilfe einer 1,5 ml NiNTA-Drucksäule (Qiagen, die Säule wurde nach Herstellerangaben gepackt) in Verbin-

dung mit einem FPLC System (GE Healthcare Biosciences). Die NiNTA-Matrix wurde vor jedem Gebrauch mit 6 M Guanidiniumthiocyanat gewaschen. Durch 100 mM EDTA wurde Nickel von der Säule gewaschen und durch anschließendes Äquilibrieren mit 100 mM Nickelsulfat wieder neu gebunden. Die verwendeten Puffer wurden vor ihrer Verwendung durch eine 0,45 µm Nitrozellulosemembran (Millipore) filtriert und entgast. Alle Arbeiten erfolgten bei 4 °C. Die Membransuspension wurde mit einer Flussrate von 0,2 ml/min auf die mit Solubilisierungspuffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7,2; 5 % (v/v) Glycerin; 320 mM NaCl; 0,5 % (v/v) Triton X-100; 10 mM Imidazol) äquilibrierte Säule gepumpt. Anschließend wurde mit 10 ml Waschpuffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7,2; 5 % (v/v) Glycerin; 320 mM NaCl; 0,5 % (v/v) Triton X-100; 20 mM Imidazol) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min gewaschen. Die Elution der SQR/His erfolgte über einen 20 ml Gradienten von 20-250 mM Imidazol bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die Fraktionen, die Aktivität enthielten, wurden vereinigt und über eine Amicon Ultra Ultrafiltrationseinheit mit einer Ausschlussgröße von 15 kDa (Millipore) konzentriert und umgepuffert. Gereinigte SQR/His lag anschließend in etwa 1 ml Solubilisierungspuffer ohne Imidazol mit 50 % (v/v) Glycerin vor. Die SQR/His konnte so bei -20 °C gelagert werden.

2.11 Biochemische Methoden

2.11.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Es wurden jeweils 0,5-20 µl der Probe mit 200 µl Bradfordreagenz (Bio-Rad Protein Assay) versetzt, der Ansatz mit H₂O auf 1 ml aufgefüllt und für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gegen einen Nullwert bestimmt. Die Erstellung der Kalibrierungsgeraden erfolgte mit Rinderserumalbumin als Standard.

2.11.2 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte durch eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Die Herstellung der Lösungen, das Gießen der Gele und die elektrophoretische Trennung erfolgten nach Sambrook *et al.* (1989). Die SDS-PAGE wurde mit 12 % Trenngelen in PerfectBlue Twin S oder M Systemen (Peqlab) nach Herstellerangaben durchgeführt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/5 Volumen Probenpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 5 mM EDTA; 5 % (w/v) SDS; 25 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 50 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Pro-

ben, die aus einer Hefereinigung stammten, wurden zusätzlich mit 0,5 µl Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) versetzt und 3 min bei 85 °C denaturiert.

2.11.3 Färbung von Proteingelen

2.11.3.1 Coomassiefärbung

Die Coomassiefärbung von Proteingelen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Heukeshofen und Dernick (1988). Eine Tablette Phast Gel Blue R-350 (GE Healthcare Biosciences) wurde in 80 ml H₂O unter Rühren gelöst. Nach Zugabe von 120 ml Methanol wurde die Lösung filtriert und bei 4 °C gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch wurde eine 1:10 Verdünnung der Lösung mit 10 % (v/v) Essigsäure angefertigt und auf 90 °C erhitzt. Die Lösung wurde heiß auf das Gel gegeben und 60 min geschüttelt. Anschließend wurde der Hintergrund mit 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt.

2.11.3.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung von Proteingelen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Blum *et al.* (1987). Die Gele wurden für mindestens 1 h fixiert (30 % (v/v) Methanol; 12 % (v/v) Essigsäure) und anschließend zunächst zweimal 30 min in H₂O, anschließend dreimal 20 min in 30 % (v/v) Ethanol gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 1 min in 0,02 % (w/v) Na₂S₂O₃, anschließend wurde dreimal für jeweils 20 s in H₂O gewaschen. Danach wurden die Gele für 30 min imprägniert (0,2 % (w/v) AgNO₃; 0,075 % (v/v) Formaldehyd) und für zweimal 2 min in H₂O gewaschen. Nach der Entwicklung in 6 % (w/v) Na₂CO₃; 0,4 % (w/v) Na₂S₂O₃; 0,05 % Formaldehyd bis zur gewünschten Färbung wurden die Gele abschließend für mindestens 10 min in Stopplösung (50 % (v/v) Methanol; 12 % (v/v) Essigsäure) inkubiert.

2.11.4 Western Blot

Für einen immunologischen Nachweis der SQR/His wurden die Proteine aus der SDS-PAGE mittels elektrophoretischen Transfers auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (nach Gershoni und Palade 1983). Der Transfer erfolgte in einer Halbtrockenzelle (Nova Blot Multiphor II, GE Healthcare Biosciences). Die Nitrozellulosemembran (Hybond C Extra, GE Healthcare Biosciences) wurde vor Verwendung 5 min in H₂O äquilibriert. Die Anode der Halbtrockenzelle wurde mit H₂O befeuchtet und anschließend 3 Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei aufgelegt, die zuvor mit Transferpuffer (39 mM Glycin; 48 mM Tris; 0,037 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Methanol) getränkt wurden. Auf das Whatman-

Papier wurde luftblasenfrei die Nitrozellulosemembran gelegt, gefolgt von dem in H₂O gewaschenen Polyacrylamidgel. Zum Schluss wurden 3 weitere mit Transferpuffer getränkte Lagen Whatman-Papier aufgelegt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 0,8 mA/cm². Zur Kontrolle des Proteintransfers wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S (0,2 % (w/v) Ponceau S; 3 % (v/v) Essigsäure) reversibel gefärbt.

2.11.5 Immunodetektion

Zum Nachweis der rekombinanten SQR/His diente ein monoklonaler Maus IgG His-Tag Antikörper der Firma Novagen. Die Nitrozellulosemembran (siehe 2.13.4) wurde für 1 h in Blockingpuffer (3 % (w/v) BSA in TBS [10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl]) geschwenkt und anschließend 2 x 10 min in TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween 20; 0,2 % (v/v) Triton X-100) sowie 1 x 10 min in TBS inkubiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (0,1 µg/ml in Blockingpuffer) erfolgte für 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C auf einem 3D-Taumelschüttler (Multi 3D-Shaker, Peqlab). Anschließend wurde die Membran 2 x 10 min mit TBS-T und 1 x 10 min mit TBS gewaschen. Der Zweitantikörper (ImmunoPure Goat Anti-Mouse IgG, (H + L) Peroxidase Conjugated, Pierce) wurde in einer 1:30000 Verdünnung in TBS und 1,5 % (w/v) Magermilchpulver eingesetzt. Nach 1 h bei RT wurde die Membran 3 x in TBS-T gewaschen. Die Nachweisreaktion der Meerrettich-Peroxidase erfolgte durch Mischen von 3 ml Lösung A (0,1 M Tris-HCl, pH 8,6; 1,25 mM Luminol), 300 µl Lösung B (6 mM para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO) und 0,9 µl 30 % (v/v) H₂O₂. Das Gemisch wurde auf die Membran gegeben und für 2 min dort belassen. Je nach Signalstärke wurde die Membran für 1-10 min auf einem Film (Lumi-Film Chemiluminescent Film, Roche) exponiert.

2.11.6 Enzymatische Tests zur Bestimmung der SQR-Aktivität

Die Bestimmung der SQR-Aktivität erfolgte nach modifizierten Methoden von Vande Weghe und Ow (1999) und Shahak *et al.* (1994).

2.11.6.1 Cyanid-abhängiger SQR-Aktivitätstest

Ein typischer 1-ml Reaktionsansatz enthielt 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM KCN; 100 µM decyl-Ubichinon (Sigma) und 1-100 µg Protein. Gestartet wurde mit 100-200 µM Sulfid und die Abnahme der Extinktion wurde bei 275 nm für 3 min verfolgt. Decyl-Ubichinon hat bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum. Der millimolare Extink-

tionskoeffizient beträgt bei 275 nm $15 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Morton 1965). Die Reaktion fand in Gegenwart von Sauerstoff statt.

Für die biochemische Charakterisierung der SQR/His wurden die Konzentrationen der Substrate Sulfid, Cyanid und decyl-Ubichinon variiert. Außerdem wurde das pH-Optimum durch Bestimmung der Aktivität bei verschiedenen pH-Werten in unterschiedlichen Puffern und die Wirkung des Hemmstoffes Antimycin A (Sigma) bestimmt.

2.11.6.2 Thioredoxin-abhängiger SQR-Aktivitätstest

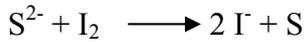
In Anwesenheit von Thioredoxin und Sulfit konnte SQR-Aktivität ohne Cyanid gemessen werden. Ein 1-ml Reaktionsansatz enthielt 50 mM Kaliumphosphat, pH 8,2; 100 μM decyl-Ubichinon; 20 mM Sulfit (die Stammlösung wurde täglich frisch in N_2 -begastem Wasser angesetzt); 15 μM Thioredoxin und 3-100 μg Protein. Um das oxidiert vorliegende Thioredoxin zu reduzieren, wurden außerdem 0,2 U Thioredoxin-Reduktase und 1 mM NADPH hinzugegeben. Die Reaktion wurde mit 20 μM Sulfid gestartet und die Abnahme der Extinktion bei 275 nm für 5-10 min verfolgt.

Für die biochemische Charakterisierung wurden die Konzentrationen von Sulfid und Sulfit variiert.

2.11.7 Arbeiten mit Sulfid

In wässrigen Lösungen reagiert Sulfid (Na_2S , HNaS , H_2S) sehr leicht mit Sauerstoff (Millero *et al.* 1987), so dass zur Vermeidung einer chemischen Oxidation die Sulfidstammlösungen stets frisch am Versuchstag in lichtgeschützten Flaschen angesetzt wurden. Hierzu wurde deionisiertes Wasser etwa 30 min mit Stickstoff 4.0 (Messer Griesheim) begast. Je nach gewünschter Konzentration wurden einige Sulfidkristalle gelöst und die genaue Konzentration der Lösung anschließend photometrisch bestimmt. Hierzu wurde der Spektroquant Sulfidtest (Merck) nach Herstellerangaben verwendet. Die Reaktion basiert auf einer im Jahr 1877 von Caro patentierten Methode zur Herstellung des Farbstoffs Methylblau. Hierbei reagiert Sulfid mit N, N'-Dimethyl-1,4-phenylendiamin zu farblosem Leukomethylblau, welches dann durch Eisen(III)-sulfat zu Methylblau oxidiert wird. Da Sulfid in Gegenwart von Sauerstoff rasch oxidiert, wurde es zunächst als Zinksulfid fixiert. Hierzu wurden 50 mM Zinkacetat in 0,15 M NaOH in Sarstedtröhrchen vorgelegt. Es wurden 900 μl H_2O sowie 100 μl der Sulfidlösung hinzugegeben. Die Mischung wurde gut geschüttelt und anschließend wurden die Lösungen des Spektroquant Sulfidtests nach Herstellerangaben hinzugegeben. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei 665 nm.

Für die Erstellung einer Kalibrierungsgeraden wurde die Konzentration der eingesetzten Sulfidlösung zuvor iodometrisch bestimmt (Poethke 1973). Die Iodometrie beruht auf der Reduktion von I_2 zu I^- durch Sulfid und der darauffolgenden Reduktion des I_2 -Überschusses durch $Na_2S_2O_3$.



5 ml einer 0,1 N I_2 -Lösung wurden in einem Becherglas unter Rühren mit 50 ml Sulfidstammlösung vermischt. Die Mischung wurde mit Titrisol (0,1 N Thiosulfat, Merck) bis kurz vor dem Endpunkt titriert. Die Zugabe von 1 ml 1 % Stärke erleichterte die Erkennung des Endpunktes durch den Farbumschlag von blau nach farblos. Mit Hilfe der Menge der verbrauchten Thiosulfatlösung ließ sich die Konzentration der Sulfidlösung berechnen.

2.11.8 Bestimmung von Sulfid, Sulfit und Thiosulfat mittels HPLC

Um mögliche Endprodukte der SQR-Reaktion zu identifizieren, wurden Thiosulfat, Sulfid und Sulfit mit einer nach Newton *et al.* (1981) und Vetter *et al.* (1989) modifizierten Methode mittels HPLC gemessen. 50 μ l des Aktivitätsansatzes (siehe 2.13.6) wurden mit 10 μ l Monobromobimane (Sigma), 50 μ l HEPES/EDTA (160 mM HEPES; 16 mM EDTA, pH 8,0) und 50 μ l Acetonitril (Baker) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Durch Zugabe von 100 μ l 65 mM Methansulfonsäure wurde die Reaktion gestoppt und die Proben konnten bei $-20^\circ C$ bis zur Analyse aufbewahrt werden.

Die Thioladdukte wurden in einem 2,5 % Essigsäure/Methanol-Gradienten aufgetrennt und fluorimetrisch detektiert (F-1050 Fluorescence Spectrophotometer, Merck/Hitachi). Als Trennsäule diente eine 12,5 cm lange RP select B (5 μ m) Chromatographiesäule (LiChrospher 60, LiChroCART 125-4, Merck). Druck und Gradienten erzeugte ein Niederdruckpumpensystem L-6200 Intelligent Pump mit LC Organizer der Firma Merck/Hitachi. Die Substanzen wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min bei einer Temperatur von $20^\circ C$ eluiert. Zur Fluoreszenzdetektion wurde eine anregende Wellenlänge von 380 nm eingestellt und das emittierte Licht bei 480 nm gemessen.

2.11.9 Bestimmung von Thiocyanat

Thiocyanat wurde nach einer modifizierten Methode des Rhodanase-Aktivitätstests bestimmt, wie er von Aminlari und Gilanpour (1991), basierend auf den Arbeiten von Sorbo

(1953,1957), beschrieben wurde. Thiocyanat bildet mit Eisennitrat einen farbigen Ferri-thiocyanat-Komplex. Die Absorption kann bei 460 nm gemessen werden. Für die Konzentrationsberechnung wurde ein Extinktionskoeffizient von $3,17 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ verwendet.

Zu einem Reaktionsansatz wie unter 2.13.6.1 beschrieben wurden zunächst 250 μl Formaldehyd (37 %) und anschließend 1,25 ml Eisennitrat (410 mM in 14 % (w/v) Salpetersäure) hinzugeben. Bei Kontrollproben wurde das Enzym erst nach Formaldehyd-zugabe pipettiert.

2.12 Sequenzspezifische Mutagenese

Um Einblicke in den Reaktionsmechanismus der SQR des Wattwurms zu erhalten, wurden 6 Aminosäuren durch sequenzspezifische Mutagenese ausgetauscht.

Es wurden Primer gemäß Turchin und Lawler (1998) mit dem Programm „The Primer Generator“ (<http://www.med.jhu.edu/medcenter/primer/primer.cgi>) erstellt, die es erlaubten, positive Mutationsklone anhand von neu eingefügten Schnittstellen bereits vor der Sequenzierung zu identifizieren.

Für die Mutations-PCR diente die Wildtyp-SQR mit den Schnittstellen *HindIII* und *XbaI* in dem Vektor pGEM-T Easy als Matrize. Für diese Reaktionen wurde die *Pfu*-Ultra Polymerase (Stratagene) nach Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurden 2 Ansätze mit 25 μl Endvolumen angefertigt, die jeweils nur einen der beiden Primer enthielten. In einem Thermocycler der Firma MWG Biotech (Primus 25) wurde folgendes Programm angewandt (nach Wang und Malcolm 1999).

95 °C	5'	
95 °C	30 s	} 5 x
60 °C	1'	
72 °C	5'	
72 °C	10'	

Anschließend wurden die Ansätze vereinigt und das gleiche Programm mit 20 Zyklen gestartet.

10 μl des PCR-Ansatzes wurden in einem 1 % Agarosegel mit Ethidiumbromid analysiert, der Rest wurde für 3 h bei 37 °C mit dem Enzym *DpnI* gespalten. Hierdurch wurde das Matrizenplasmid aus dem Ansatz entfernt, da *DpnI* nur methylierte DNA spaltet. Elektrokompente *E. coli* XL1-Blue Zellen wurden mit 1-3 μl des Ansatzes transfor-

miert und auf LB/Amp-Selektivmedium ausplattiert. Die Kolonien wurden einer Kolonie-PCR mit den Primern SQR-*HindIII* und SQR-*XbaI* unterzogen. Das PCR-Produkt wurde mit den bei der Primererstellung ausgewählten Restriktionsenzymen gespalten. Von den Kolonien, deren PCR-Produkt nach der Spaltung ein zum Wildtyp unterschiedliches Bandenmuster im Agarosegel zeigte, wurden Plasmide isoliert und diese sequenziert. Anschließend wurde das mutierte *sqr*-Gen in den Hefevektor pYES2/CT kloniert und exprimiert. Es wurden 1 Liter Expressionskulturen angefertigt, von denen Mitochondrienmembranen (2.9.6) isoliert wurden. Die Aktivität wurde gemäß 2.11.6 überprüft, ebenso wie der Erfolg der Expression mittels Western-Blot (2.11.4/5).

2.13 Bioinformatische Methoden

2.13.1 Sequenzanalyse

Zur Eingabe, Analyse und Bearbeitung von Sequenzen wurde das GCG Programmpaket (Version 10.3) der Genetics Computer Group, University of Wisconsin, verwendet (Devereux *et al.* 1984).

2.13.2 Datenbankvergleiche

Die Suche nach homologen Sequenzen in GenBank erfolgte mit Hilfe der Programme BLASTn, BLASTx und BLASTp des BLAST-Pakets am NCBI (Altschul *et al.* 1990). Ein Alignment wurde mit dem Programm ClustalW (Thompson, Higgins und Gibson 1994) erstellt und anschließend überprüft und manuell korrigiert.

2.13.3 Phylogenetische Analysen

Es wurde ein globales, multiples Alignment mit dem Programm Clustal W erstellt (Thompson, Higgins und Gibson 1994). Basierend auf dem Alignment wurde, nachdem die Lücken des Alignments mit dem Skript „sortal3“ entfernt worden waren, mit Hilfe der Programme LogDet (Thollesson 2004) und Neighbor-Net (Bryant und Moulton 2004) eine phylogenetische Analyse der molekularen Daten durchgeführt. Mit einer Variante des Neighbor-joining-Algorithmus (Saitou *et al.* 1987) wurde ein Netzwerk berechnet, das mit dem Programm SplitsTree4 (Huson *et al.* 1998) dargestellt und mit Hilfe des Grafikprogramms CorelDraw 11 nachbearbeitet wurde.

Für die Maximum-Likelihood Analyse eines Proteinalignments wurden zunächst die Lücken mit dem Skript „sortal3“ entfernt und das Alignment anschließend in das PHYLIP-Format umgeschrieben (Felsenstein 1980). Maximum-Likelihood Analysen wur-

den mit dem Programm PROTML (Adachi und Hasegawa 1996) durchgeführt. Der phylogenetische Baum wurde anhand der berechneten Daten mit dem Programm TreeView dargestellt und mit dem Grafikprogramm CorelDraw 11 nachbearbeitet.

2.13.4 Voraussagen über mögliche Transitpeptide

Mögliche Signalpeptide wurden mit Hilfe des Programms MitoProtII (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) (Claros und Vincens 1996) und iPSORT (<http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/>) (Bannai *et al.* 2001, Bannai *et al.* 2002) untersucht.

2.13.5 Berechnung des Molekulargewichts und des isoelektrischen Punkts

Das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt wurden mit Hilfe des Online-Tools „Compute pI/Mw“ (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi-tool>) berechnet.

2.14 Auswertung der kinetischen Daten

Die Auswertung und Darstellung der kinetischen Daten erfolgte computergestützt mit dem „Enzyme Kinetics Module“ des Programms Sigma Plot 9.0 (Jandel Scientific). Bei Reaktionen, die einer Michaelis-Menten Kinetik entsprachen, erfolgte die Berechnung von K_m und V_{max} nach der Formel

$$V = V_{max} \cdot ([S]/([S] + K_m)).$$

Wurde eine Substrathemmung angenommen, wurden K_m , V_{max} und K_i nach folgender Formel berechnet:

$$V = V_{max}/(1+(K_m/[S]) + ([S]/K_i)).$$

Die graphische Darstellung der kinetischen Daten als nicht-lineare Regression erfolgte mit Hilfe des Programms Sigma Plot 9.0 (Jandel Scientific).

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung des *sqr*-Gens von *Arenicola marina* aus einer cDNA-Bank

Eine BLASTp-Suche mit dem *sqr*-Gen der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* (NP_596067, vande Weghe und Ow 1999) erbrachte Treffer in vielen damals sequenzierten eukaryotischen Genomen (Theissen *et al.* 2003). Aus cDNA der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurde das *sqr*-Gen (NP_647877) mit den Primern „Drosoforw“ und „Droso-rev“ (siehe 2.6) amplifiziert und als Sonde für eine Plaque-Hybridisierung eingesetzt. Es konnten zwei positive Klone identifiziert werden (A22-1 und A25-1), die sich als identisch erwiesen (Sequenz ist im Anhang dargestellt). Ausgehend von der Sequenz des Klons A22-1 wurde eine homologe *sqr*-Sonde mit den Primern „Amarfor“ und „Amarre“ amplifiziert und diese in einer erneuten Plaque-Hybridisierung mit einer nicht amplifizierten cDNA-Bank eingesetzt. Es konnten zwei unterschiedliche Klone identifiziert werden, die jedoch kein vollständiges offenes Leseraster für die SQR kodierten. Die vollständige Sequenzierung der drei Klone erfolgte durch „Primerwalking“ mit den unter 2.6 aufgeführten Oligonukleotiden.

Klon A22-1 hat eine Länge von 3317 bp und kodiert ein vollständiges offenes Leseraster von 1377 bp. Für die restlichen Basenpaare konnte mit BLASTx kein weiteres offenes Leseraster identifiziert werden. Das Leseraster mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz ist in Abb. 3.1 gezeigt. Das Protein mit 458 Aminosäuren hat ein errechnetes Molekulargewicht von 51 kDa und ist mit einem errechneten isoelektrischen Punkt von 9,1 basisch. Das Programm iPSORT sagt ein Signalpeptid von 30 Aminosäuren mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % voraus. MitoProtII sagt voraus, dass das Protein mit einer Wahrscheinlichkeit von 97 % in die Mitochondrien importiert wird und die Transitsequenz eine Länge von 80 Aminosäuren hat.

Die BLASTp-Suche ergab eine Aminosäure-Übereinstimmung von 35 % mit der Sequenz aus *S. pombe* bei einem E-Wert von $4 \cdot e^{-69}$. Mit der SQR aus *Rhodobacter capsulatus* wies die Sequenz 23 % Aminosäureidentität bei einem E-Wert von $2 \cdot e^{-4}$ auf. Treffer fanden sich auch zu Sulfid-Dehydrogenasen (Flavocytochrom c, FCC). Mit der Sequenz der Flavoprotein-Untereinheit des FCCs aus *Allochromatium vinosum* (AAB86576) war die Wattwurm-SQR Aminosäuresequenz 23 % identisch, der E-Wert betrug hier $2 \cdot e^{-11}$.

Ergebnisse

GCAGCCGCTCGTGGATTTTGGGTGTCCTTTCTTCCAAGGCGCAAGGACGTCCCCGCAACC 60
GGCAGAGCGTTACGTTAACAGTTCTCCACTCCATCGCAACGAGTAATTGTCAGCATGGCC 120
M A

TCACGCAAGGTTTCCCTGGTCTCACGGGCCGGGTGTTGATGTGCCAGCAGCTCCCCGCC 180
S R K V S L V L T G R V L M C Q Q L P A

CAGGCGGCCAGGGCTGCCGTGGCCCCCACGTGCTTCCCTTCAGCAGCTCGGCCCCGCTG 240
Q A A R A A V A P H V A S F S S S A P L

GAGACCGCCAAGAAGATGAACTACAAGATGGTGGTGGTTGGCGGCGGCACGGGAGGATGC 300
E T A K K M N Y K M V V V G G G T G G C

GCTGCTGCTCACATGTTTCTCCAGGAAGCTCGGCAAGGGCAACGTGGCCGTCATCGAGCCG 360
A A A H M F S R K L G K G N V A V I E P

GCCGACCCACTACTATCAGCCTCTGTGGACGTTGGTTCGGTGGCGGCCTGCGCAAGCTG 420
A D T H Y Y Q P L W T L V G G G L R K L

GATCAGTCGGCCAGCCCATGAACAAGGTCCTGCCCGGCGCCTGTGACTGGATCAAGGAC 480
D Q S A Q P M N K V L P G A C D W I K D

TCAGCCGTCCAGTTTGATCCAGACAACAACACCGTCTTACCAAACATGGATACGAGGTG 540
S A V Q F D P D N N T V F T K H G Y E V

AAATACGACTTCTTGTATGCGCCATGGGGTTACAGCTCAACTACCACTTGATAAAGGGG 600
K Y D F L V C A M G L Q L N Y H L I K G

CTGCCAGAAGCCTTCGACGTCGACCCAAGTCTGTGTTCAAACACTGGGACAAGACCGTG 660
L P E A F D V D P S L C S N Y W D K T V

ATCAAGACGAGGCCAGCCATGGAAGCTGTCACCGAGGGGAATGTCATCTTACCTTCCCT 720
I K T R P A M E A V T E G N V I F T F P

AACTCGCCCATCAAATGTGCCGGCGCGCCGCAAAAAATCATGTATCTGACAGAAGAGTAC 780
N S P I K C A G A P Q K I M Y L T E E Y

CTGAGACAGTCCGGTAAGAGGGACAAGACCAACGTGATCTATAACACTTCCCTTGGCGTT 840
L R Q S G K R D K T N V I Y N T S L G V

GTCTTCGGAGTGAAGAAGTACGCTGAAGCTCTTACCAAAATCGTCCAAGAAAGAAATATT 900
V F G V K K Y A E A L T K I V Q E R N I

CAGGTGAACTTTCGACACAACCTCATTGAAGTAAGGCCAGACAAGAAGGAGGCAGTCTTT 960
Q V N F R H N L I E V R P D K K E A V F

GAGCATCTGGACACGAAGGAACAGAAAGTATTCGATTACGCCATGCTGCACGTGGTGCCT 1020
E H L D T K E Q K V F D Y A M L H V V P

CCCATGTGCAGCCCCGAGGCGCTGTGGAACAGCCCGCTGGTGAACGAGAGTGGTTACGTC 1080
P M S T P E A L W N S P L V N E S G Y V

ACCGTCAAGAGGGAGACCCTGCAGCACACCAAGTACCCTAATGTCTTCCGCATCGGTGAC 1140
T V K R E T L Q H T K Y P N V F G I G D

AACACGGATATACCGACGGCCAAGACAGCCCGCTGTGGCATCTCAAACCTGGCATCCTC 1200
N T D I P T A K T A A A V A S Q T G I L

AAGAAAAACCTTGCCGCTGCCATGAACGGCCATGAAATAGCTGGAAAGCAATACGACGGC 1260
K K N L A A A M N G H E I A G K Q Y D G

TACACGTCCTGCCCCCTGGTGCAGGTAAGAATACTGTGATCATGGCGGAGTTTACTG 1320
Y T S C P L V T S K N T V I M A E F D W

```

GACGGCCAGCCCCTCGAGACCTTCCCGATCAACCAGGCCAAGGAGAGGCGAACGATGTTTC 1380
D G Q P L E T F P I N Q A K E R R T M F

CACTTCAAGGCTGATATCTTCCCCCAGATGTACTGGCACATGCTTATCAAGGGCTATTGG 1440
H F K A D I F P Q M Y W H M L I K G Y W

CATGGACCCGGTCTGTTCCGGAAGGCAATGCACTTGGGTATGAGTCGGTAGGCGGCGCTG 1500
H G P G L F R K A M H L G M S R .

TCACAGGACCCGGAATCCTTGTCTGCACTATCGTTCACCAGAAGGCGCTGATGCTGTTCA 1560
TGGAGATGTAAAGACGTCATTTCCGGTTCGTCACAGCTGGATAACAAGCAGTTGTTGGTGA 1620
TAGCATGTGGTTAAATGCAGTTTGTCTTTAATTAATGTATCATCATTTTGTGTACATGT 1680
TTCTGGTCTCTGGACAAGGAAACGAAAACAATGGCTTTATGTCAATGCAGGAATCATGCA 1740
ACATACAATTTATATGTAAAGAATATGCGAAAACAATTTACCCAGTATATATAACATATTG 1800
GTCGGACTATCCCGGTAATGTCACGCCATGTAATTTGAAAGAGTATTGATGCTTTACCAT 1860
CACATGTATGTGTAATGTCTTATTGTGTAACCAATAACGGAGTGTTCATTTATTTGGTG 1920
AGATGCCTGCTTTGGTGGCCTTGAGTTTGCATAACCATACTGTTGATTTACTCATTCAT 1980
CGCGCTTGCAAAGCACCTGATGACGTGATTTAGCGAACTGATATGTATTTGTTACTGTA 2040
CCATAAGAATAAGAATATTATACCCACTCTTGATAATTTGTTTCGTGATTTGTGTCCATTG 2100
CGGTTGAAACCAGCCATGTGTACGCGATATACGCCATTAGATTGTGACGTGTGCAGTTTA 2160
ACAATGAATGTGTTTGTACTTGGTATTCGTCTACCTTTCTGTTTATTCTAAGAAATGGTT 2220
CAATATGATGTAATGGGGGAGTCAATCACAAGTAATGATTTGTTGTATGCATCAAGTCGT 2280
CTGTGGAGGTGTATGCTCGTTCGACATTAACGTTAATCTGTAATCTGCATCTATGTA 2340
GATTATGTTGAAATGTCCCTTCTGGCCTACATGAAATCCTGGCTTTTTGCTTTACTGAGAC 2400
TTCGATTCATTTTATATCAGCCCCATAGGTGATGAGTCTGTTCATGGTTGTGAAAGCTAG 2460
ATACGAGACTCACAGTTTGTATGAATTCGTATAAAATATGGCAGGGTTCCTCGTCATCTGT 2520
TTAATATATGTATCTATTGCTATTGTGAACCTCTGTAATAAAGGACGACGCGGTATATCTGT 2580
ATGACTAAACTGGAATAGTGAGCCAGTAGTGAATTCGCTGGACGGGTGGAAGTAACGAC 2640
ATGGAATTCGGTTGCCGGGTTTATTGAAAGTTAAGTACATTTTGAATATACGGCGTTCAA 2700
ATGAACTGTACACAGACCGTAGACGGCTAAAGGTTTTATGTCTATTTGAAAGTCCAAGA 2760
CGTCGCATCGTTCTAGTGCAGTTGCTCAAAATTTATTTGATTATTTGCTATACATTTGT 2820
TGAGTTATATCTGCTTGCCTGCTGTGGAGTTTTACTGAAAATTTACTCTACTTTTTCGATC 2880
GTTGAAACGTTGAACTATTACAGGGATGTTCCCTGCCAAGCAAGGTGTTGCATACGTGATGA 2940
CCTTTTGTATTTGATACCATCGGTCACGGAATTTTATACTGCTTCTTATGGTATGTTGACA 3000
TAAGCAGTTGGACATAGACAATGAGTAAGTGATGGAGATTTTCGTTTTTTCTTTGTAATGC 3060
ATGTCCTGCGATATGCGCCTGAATTCGCGCAGTTACGTTACCAGGGCAAATACTTTGTT 3120
TAGTTTTATGCAAACTATATTGAGATACATATTTCCGCTGCATCAAACGCATCAAATGC 3180
ATTTTTTTAGGGAAGTGGTGCATATACATAACAGACAATAGACGTTGTCAGTTGTATAA 3240
GATAGCTTTCATGCCTGTAGATTTAATACATTTAGAATAAATATGAAAACAATGTAACCA 3300
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3317

```

Abb. 3.1: **Sequenz der cDNA für die SQR aus *Arenicola marina* (A22-1)**. Für den kodierenden Bereich ist unterhalb der Nukleotidsequenz die abgeleitete Aminosäuresequenz (grau unterlegt) dargestellt. Die vorhergesagte Transitsequenz von 80 Aminosäuren ist dunkelgrau markiert.

3.2 Identifizierung von SQR-Fingerprints und konservierten Bereichen

Durch Blastsuche konnten SQR-Homologe in Genomen von Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryoten identifiziert werden. Das ClustalW-Alignment musste aufgrund der geringen Konservierung der Sequenzen manuell bearbeitet werden. Vergleiche der Wattwurmsequenz mit einer anderen eukaryotischen SQR, z.B. aus *Homo sapiens*, zeigten, dass die Sequenzen zu 54 % identisch waren. Ein ähnliches Bild ergab sich beim Vergleich von zwei eubakteriellen SQRs, z.B. *Rhodobacter* und *Aquifex*, die 41 % Sequenzenidentität aufweisen.

	Cystein 159	FAD-Bindedomäne III	Glycin 299	Cystein 353
	*		*	*
<i>Rhodobacter c.</i>	AAQGASCFGPAYEF 159	GFVI VDQHQONPTFKNVFAVGV	299	SWNAVCLADFGDK 353
<i>Rhodobacter s.</i>	AAQGASCFGPAYEF 201	GFTLVDPHQRNPTFPNI FAVGV	340	TWNAVCLADFGDR 394
<i>Magnetococcus sp.</i>	AVQGASCFGPAYEF 160	GFVKVDKHORNTVWPNI YSAGV	301	TWNAI CLADMGDT 355
<i>Thiobacillus d.</i>	AVQGASCYGPAYEF 160	GF I TI DPYORNPKYPNVVSV	300	TWNAI CLADFGDT 355
<i>Nostoc sp.</i>	ALPKTSCCLGPAYEF 158	GF I PVLPTYRHPEYASI YAVG	289	TLDAI CFADFGNS 344
<i>Oscillatoria l.</i>	AVPGASCFGPAYEF 159	GFVPTNTYQHPKYESVVSAGVI	292	TLEAI CI ADFGDT 345
<i>Aphanothece h.</i>	AVPGASCMGPAYEF 160	GFLPVLDTYQHPDYPYPSI YSAG	293	SLEAI CMADFGDT 346
<i>Thermosyn. e.</i>	AAPGASCFGPAYEF 156	GFLLPLLPTLQHPNYPEI YGVGI	286	TLDALCFADFGNT 341
<i>Aquifex a.</i>	AI PGVSCFGPAYEF 156	KMVI VNRCFQNPYTKNI FGVGV	295	RLSAI CI ADFGED 348
<i>Ralstonia m.</i>	PPMPI KCAGAPQKA 307	WVDVDPSSLRHKKYANVFLGDCT	443	DGYGSCPLTVERG 487
<i>Burkholderia f.</i>	PPMPI KCAGAPQKA 303	WVDVDQTTLRHKRFHNVYGLGD	439	DGYGSCPLTVERG 483
<i>Pseudomonas s.</i>	PPMPI KCAGAPQKA 166	WVDVDPATLKHRRFANVHGLGD	302	DGYGSCPLTVEKG 346
<i>Ralstonia s.</i>	PAMPI KCAGAPQKA 174	WCEVDPATLQHRHADVFLSGDAC	310	DGYGSCPLTVERG 354
<i>Pseudomonas a.</i>	PAMPI KCAGAPQKA 168	WCEVDPATLQHRHGEI FALGDV	304	DGYGSCPLTVERG 348
<i>Pseudomonas f.</i>	PPI PI KCAGAPQKA 169	WCEVNPHTLQHPRYPEVFALGD	305	DGYGSCPLTVEKG 349
<i>Nitrosomonas e.</i>	PPMPI KCAGAPQKA 334	YCEVNPKTLOHTRFANI FSLGD	470	DGYGACPLTVENG 514
<i>Synechocystis s.</i>	PATPI KCAGAPQKI 163	WVDVDKFTLQHNRYDNVFLGD	296	GGYTCCPLVTGYG 340
<i>Schizosacch. p.</i>	PSGVLKACAGAPQKI 204	FVAVDQSTTQSTKFPNVFAI G	339	NGYTSCLLTYG 383
<i>Aspergillus f.</i>	PAGVI KCAGAPQKV 203	FVDVDDNTLRHKRYGNVWSAGD	341	DGYTSCPLLTEYG 385
<i>Homo sapiens</i>	PNTPVKACAGAPQKI 201	WVDVDKETLQHRYPNVFVGI G	335	DGYTSCPLVTGYN 379
<i>Bos taurus</i>	PNTPVKACAGAPQKI 201	WVDVDKDTLQHKRYPNVFGI G	335	DGYTSCPLVTGYN 379
<i>Canis familiaris</i>	PNTPVKACAGAPQKI 201	WVDVDKETLQHKRYPNVFGI G	335	DGYTSCPLVTGYN 379
<i>Mus musculus</i>	PNTPVKACAGAPQKI 201	WVDVDKETLQHKRYPNVFGI G	335	DGYTSCPLVTGYN 379
<i>Xenopus t.</i>	PNTPVKACAGAPQKI 200	WVDVSKDTLQHKRYPNVFGI G	334	DGYTSCPLVTGYR 378
<i>Xenopus l.</i>	PNSPVKACAGAPQKI 195	WVDVSKDLQHKRYPNVFGI G	329	DGYTSCPLVTGYR 373
<i>Gallus gallus</i>	PNTPVKACAGAPQKI 201	WVDVNKETLQHKRYPNFI G	335	DGYTSCPLVTSYN 379
<i>Danio rerio</i>	PNTPVKACAGAPQKI 195	WLDVNKNTLQHKTYDNVFGI G	329	DGYTSCPLVTSYN 373
<i>Arenicola marina</i>	PNSPI KCAGAPQKI 208	YVTVKRETLOHTKYPNVFGI G	341	DGYTSCPLVTSKN 386
<i>Drosophila m.</i>	PNCPI KCAGAPQKI 203	FVDVDQLTLQHNKYSNVFAI G	338	DGYSSCPI VTGYS 382
<i>Anopheles g.</i>	PNSPVKCPGAPQKV 172	FVDVNKDTLQHKQFSNVFAI G	307	DGYSSCPLVTGYN 351
<i>Apis mellifera</i>	PNSPVKCPGAPQKI 172	FLSVDPKTLQHKYSNI YGI G	307	NGYSSCPLVTGYK 351
<i>Staphylococcus a.</i>	PNTPI KCGGAPMKI 164	WVDVNPTTLQHKYSNVFALGD	297	DGYTSCPI VTGYN 341
<i>Dictyostelium d.</i>	PTTGVKKCGAPQKI 204	FVNVDKGTLQHKRYDNVFLGD	326	DGYTSCPI TTSYS 380
<i>Chloroflexus a.</i>	PSTPI KCGAPQKI 178	WVEVDKHTLQHRYPNVFSLGD	311	DGYTSCPLVTGYG 355
<i>Pasteurella m.</i>	PATEMKACAGAPLKY 211	WVEVEKHTLRHRYANVFAVGD	348	NGYTSCPLI TOLG 392
<i>Rhodospirillum r.</i>	PI TEMKACAGAPLKY 213	WMEVDKASLRHRYPNFI FGVG	350	NGYTSCPLI TKLG 394
<i>Desulfohalobium d.</i>	CESPI KCPVAPLEF 159	TDKGTLSKSRW---ENMYI LG	287	DGHSTCFI LTGYE 331
<i>Chlorobium t.</i>	AELPFKCPVAPI EF 159	THHNTLKALKH---DGVYVI G	287	DGHSTCFI VYSKG 331
<i>Archaeoglobus f.</i>	MGI PHKCPVAPI EV 160	TDRYTLKAEGL---ENVVVG	288	FGKAMCFI ETGFS 332
<i>Magnetospir. m.</i>	N-APHKCPVAPLEF 160	TNTKTLHREGS---TNVFWG	287	DGKVFVCFVETGLG 331
<i>Sulfolobus s.</i>	AKLPHRCPVAPLEF 164	TDKFTLRMKDH---SNVYVMG	292	GGDVLVCFI ATGTD 336
<i>Pyrobaculum a.</i>	TSTPYKCPVAPYEF 160	VDRHTLQI QAOGATGAEYAI G	287	DGRVI CFI LTGFE 331
<i>Ferroplasma a.</i>	ASTPFQCPVAPGEF 157	VDKFTLEYSYD---DNVFAVG	285	DGFMGCSI YAEQ 328
<i>Sulfolobus t.</i>	F-GI I KCPMAPFEF 145	VDKKELNYKDY---SDVFWG	266	DGKAMCAGYAGYN 310
<i>Thermoplasma v.</i>	SSQWYKCPPVWEM 155	TNLKDFRNPKY---DDI FAI G	286	NKNAVCI I ATG-S 331

Abb. 3.2: **Konservierte Bereiche aus dem Alignment der SQR-Sequenzen.** Die konservierten Aminosäuren entsprechen Cys 159, der FAD-Bindedomäne III mit Gly 299 und Cys 353 nach der Nummerierung von Griesbeck *et al.* (2002). Die Position der fettgedruckten Cysteine und des Glycins ist für jede Sequenz angegeben. Die Gruppen I, II und III sind durch Leerzeilen voneinander getrennt und die SQR-Sequenz aus *Arenicola marina* (Gruppe II) ist rot hervorgehoben. Lücken im Alignment sind durch Gedankenstriche gekennzeichnet. Die Zugangsnummern der Sequenzen sind im Anhang angegeben.

Nachdem das Alignment manuell angepasst wurde, konnten drei der von Griesbeck *et al.* (2002) beschriebenen SQR-Fingerprints identifiziert werden. Cystein 159 (die Positionen beziehen sich auf die Sequenz aus *Rhodobacter*) und Cystein 353 sowie Glycin 299 aus der FAD-Bindedomäne III sind in allen SQRs zu finden (Abb. 3.2), wohingegen die von Griesbeck *et al.* (2002) beschriebenen Fingerprints Cys 127 und His 196 nicht in allen Sequenzen konserviert waren. Die umgebenden Aminosäuren der 3 Fingerprints Cys 159, Gly 299 und Cys 353 zeigten jeweils bestimmte Muster, die eine Aufteilung der Sequenzen in drei verschiedene Gruppen erlaubte (Abb. 3.2): Gruppe I umfasst Proteobakterien und Cyanobakterien, darunter auch *Rhodobacter*, *Aquifex*, *Oscillatoria* und *Aphanothece*. Die SQRs aus diesen Bakterien wurden bereits ausführlich charakterisiert (Reinartz *et al.* 1998;

Griesbeck, Hauska und Schütz 2000). Zu Gruppe II gehören alle Homologen aus Eukaryoten sowie aus einigen Proteobakterien und Cyanobakterien. Gruppe III umfasst im Wesentlichen Homologe aus Archaeobakterien und einigen Proteobakterien. Aus dieser Gruppe wurde noch keine SQR biochemisch charakterisiert. Paarweise Alignments von SQRs verschiedener Gruppen zeigten eine durchschnittliche Aminosäureidentität von etwa 25 %.

3.3 Heterologe Überexpression der Sulfid:Chinon Oxidoreduktase aus *Arenicola marina* in *E.coli*

Zur Überexpression der SQR in *E. coli* wurde zunächst das komplette offene Leseraster der SQR im Klon A22-1 gewählt. Das Gen wurde in die Expressionsvektoren pET-28a und pET-32a so kloniert, dass jeweils am N-terminalen Ende eine Fusion von 6 Histidinen (His-Tag) angefügt wurde, beim Vektor pET-32a zusätzlich noch eine N-terminale Thioredoxin-Fusion. Erste Expressionsversuche in dem Stamm BL21(DE3) in LB-Medium mit 1 mM IPTG für 3 h bei 37 °C zeigten, dass die SQR exprimiert wurde, was an deutlichen Banden im Coomassie-gefärbten Gel bzw. Western Blot mit Immunodetektion bei etwa 50 kDa zu erkennen war. Das Protein befand sich aber ausschließlich in der Pelletfraktion mit Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen als „inclusion bodies“ (engl. Einschlußkörperchen).

Variation der IPTG-Konzentration und Inkubationstemperatur sowie der Dauer der Induktion brachten keine Veränderung, so dass auf die Stämme Rosetta(DE3) und Origami(DE3) ausgewichen wurde. Auch mit diesen Stämmen wurde die SQR ausschließlich in Form von „inclusion bodies“ exprimiert. Es wurde ein SQR-Konstrukt in dem Vektor pET-28a angefertigt, bei dem nur der Bereich ab AS 80 des offenen Leserasters bis zum Stoppkodon kloniert wurde. Auch hier war eine Expression in der löslichen Fraktion auch nach Veränderung der Bedingungen nicht möglich. Es wurde zusätzlich eine Expression in YPD- und LB-Medium mit 1 M Sorbitol und 2,5 mM Betain durchgeführt, die jedoch auch ohne Erfolg blieb.

Die Stämme C41(DE3) und C43(DE3) eignen sich besonders gut für die Expression von Membranproteinen, da sie in der Lage sind, ein internes Membransystem auszubilden, das Platz für das exprimierte Protein bietet (Miroux und Walker 1996; Arechaga *et al.* 2000). Mit diesen Stämmen konnte eine Expression in der löslichen Fraktion erreicht werden, jedoch war hier keine SQR-Aktivität messbar (Aktivität bedeutet hier die Reduktion von decyl-Ubichinon in Gegenwart von Sulfid und 2 mM Cyanid; siehe 2.11.6.1). Da auch die Möglichkeit bestand, dass sich die Fusion mit 6 Histidinen am N-Terminus negativ auf die Aktivität auswirkt, wurde das vollständige *sqr*-Gen mit Hilfe der Primer SQR-*BsmBI*

und SQR-*NotI* (siehe 2.6) in den Vektor pET-24d kloniert, durch welchen ein His-Tag am C-terminalen Ende anfügt werden kann. Hier war auch in BL21(DE3)-Zellen ein Anteil der exprimierten SQR mit einer Größe von 50 kDa in der löslichen Fraktion durch Western Blot mit Immunodetektion des His-Tags nachweisbar (siehe Abb.3.3, Spur 6). Eine Aktivität war jedoch nicht messbar. Durch Ultrazentrifugation unter den angegebenen Bedingungen konnte das Protein nicht pelletiert werden, was zeigte, dass das Protein nicht an der Membran gebunden vorlag.

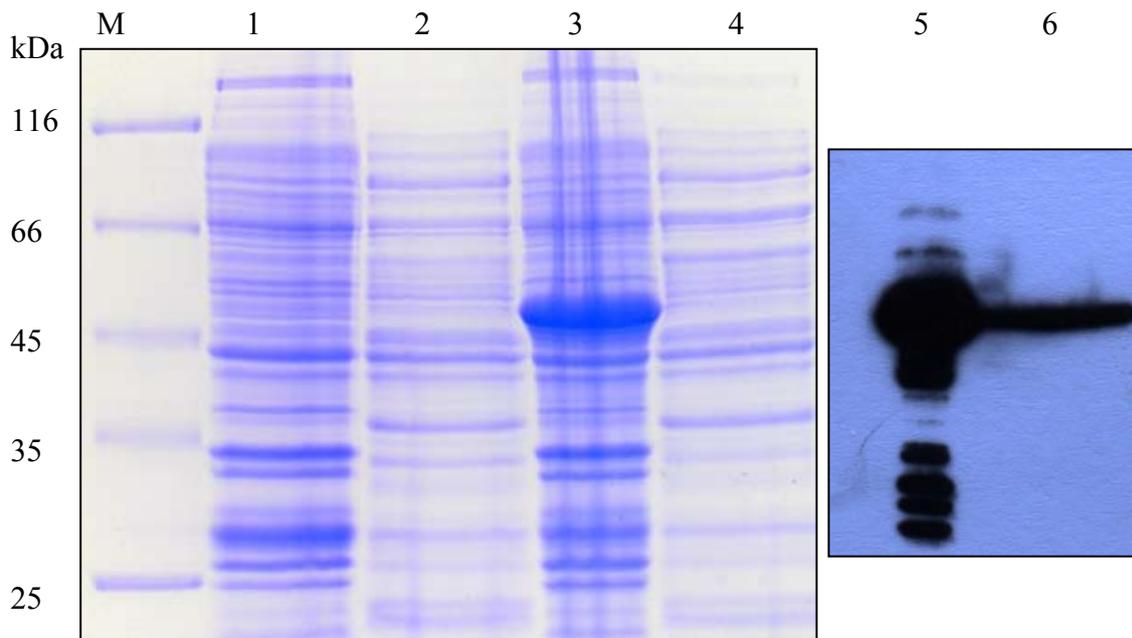


Abb. 3.3: **12 % SDS-PAGE nach Coomassiefärbung und Western Blot mit Immunodetektion** des His-Tags von Pellets und Überständen eines Aufschlusses von *E. coli* BL21 (DE3)-Kulturen in 50 ml LB-Medium mit 1 M Sorbitol und 2,5 mM Betain nach Induktion mit 1 mM IPTG für 2 ½ h bei 30 °C. Die Zellen waren mit dem Vektor pET-24d bzw. pET-24d + SQR (vollständiges Gen) transformiert. M: Größenstandard [kDa], 1: Pellet mit Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen des leeren pET-24d-Vektors, 2: lösliche Fraktion des leeren pET-24d-Vektors, 3: Pellet mit Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen des Vektors pET24-d + SQR, 4: lösliche Fraktion des Vektors pET-24d + SQR, 5: Immunonachweis des His-Tags im Pellet des Vektors pET24-d + SQR, 6: Immunonachweis des His-Tags in der löslichen Fraktion des Vektors pET-24d + SQR.

Es wurden erneut Expressionsversuche mit den Stämmen C41(DE3) und C34(DE3) zusammen mit dem Konstrukt pET-24d+SQR durchgeführt und es konnte gezeigt werden, dass ein Teil des Proteins mit der erwarteten Größe von 50 kDa in der Membran lokalisiert war (Abb.3.4, Spur 3). Mit den Detergenzien Triton X-100 oder Thesit ließ sich das Protein aus der Membran herauslösen und über eine NiNTA-Affinitätsmatrix reinigen, jedoch war auch hier keine Aktivität nachweisbar.

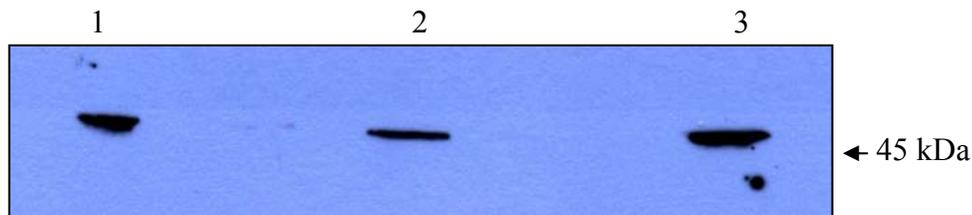


Abb. 3.4: **Western Blot mit Immunodetektion des His-Tags der SQR in pET-24d exprimiert in C43(DE3).** Induziert wurde mit 0,1 mM IPTG ÜN bei 16 °C in LB-Medium mit 1 M Sorbitol und 2,5 mM Betain. 1: Pellet mit Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen, 2: lösliche Proteine und Membranen, 3: Membranen.

3.4 Heterologe Expression der Sulfid:Chinon Oxidoreduktase aus *Arenicola marina* in *Saccharomyces cerevisiae* und Reinigung über eine NiNTA-Affinitätsmatrix

3.4.1 Expression der SQR/His in *S. cerevisiae*

Zur Expression der SQR in *S. cerevisiae* wurde das gesamte offene Leseraster mit Hilfe der in 2.6 aufgeführten Primer SQR-HindIII und SQR-XbaI in den Expressionsvektor pYES2/CT kloniert. Der Vektor ermöglichte das Anhängen eines His-Tags am C-terminalen Ende der SQR. Als Expressionsstamm diente INVSc1, der Uracil als Selektionsmarker besitzt und so mit dem Vektor pYES2/CT, der das für die Uracilsynthese benötigte Gen *ura3* kodiert, kombiniert werden kann. Als Negativkontrollen wurden Hefezellen mit unmodifiziertem pYES2/CT-Vektor transformiert. Es wurden zunächst Expressionskulturen von 200 ml angefertigt, die Zellen aufgeschlossen und die Expression über einen Western Blot mit Immunodetektion des His-Tags überprüft. In den Kontrollen war kein Signal nachweisbar, wohingegen in den pYES2/CT + SQR Proben eine Bande bei 50 kDa zu erkennen war, was dem erwarteten Molekulargewicht der SQR von *Arenicola marina* entspricht.

Um den Zielort der SQR in der Hefe zu überprüfen, wurden Mitochondrien isoliert und diese durch Ultraschall aufgeschlossen, damit anschließend durch Ultrazentrifugation die Membranen isoliert werden konnten. In *Arenicola marina* liegt die SQR an der Mitochondrienmembran gebunden vor, so dass sie auch in der Hefe dort zu erwarten war. Abb. 3.5 zeigt einen Western Blot mit Immunodetektion des His-Tags. Es ist ein Signal sowohl in der Mitochondrienfraktion als auch in der Mitochondrienmembranfraktion zu erkennen, nicht jedoch im post-mitochondrialen Überstand und in der Fraktion der löslichen Mitochondrienproteine.

Die Mitochondrien- und Membranfraktion wurden wie unter 2.11.6.1 beschrieben auf SQR-spezifische Aktivität überprüft. Kontrollversuche wurden mit Mitochondrien und Mitochondrienmembranen aus Hefen durchgeführt, die mit dem leeren pYES2/CT-Vektor transformiert worden waren. Während bei den Kontrollproben keine Aktivität nachweisbar

war, konnten in den Mitochondrien und den Membranen der Hefen, die SQR/His exprimiert hatten, Aktivitäten gemessen werden. Abb. 3.6 zeigt die spezifischen Aktivitäten einer Präparation. Die spezifische Aktivität in den Mitochondrien betrug $0,14 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ und in den Membranen $0,22 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

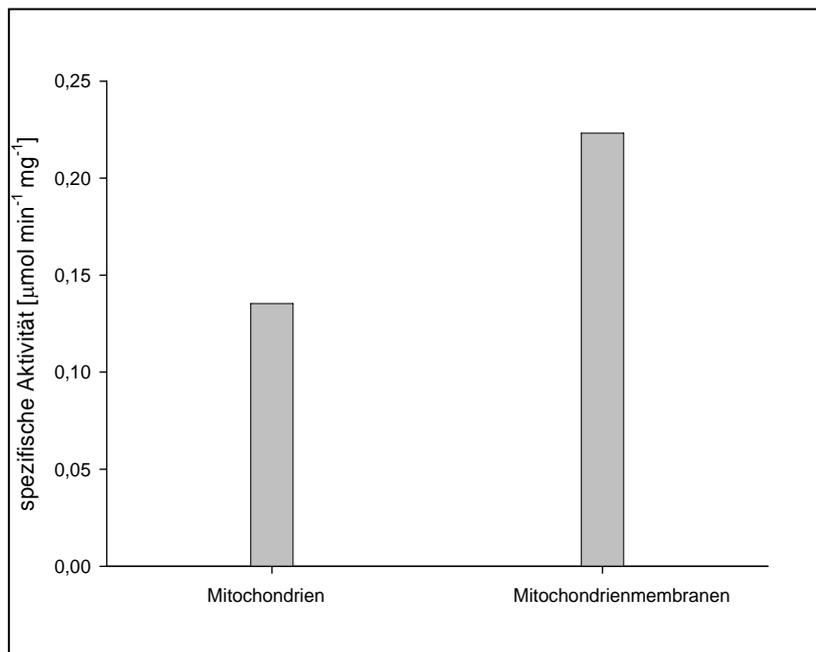


Abb. 3.6: Spezifische Aktivitäten der SQR in Mitochondrien und Mitochondrienmembranen isoliert aus Hefezellen INVSc1, die den Vektor pYES2/CT+SQR trugen. Die Aktivitätsmessung erfolgte in 20 mM Tris-HCl, pH 8,8 mit 2 mM KCN und 100 μM decyl-Ubichinon. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μM Sulfid. In entsprechenden Kontrollen mit Mitochondrien und Mitochondrienmembranen aus Hefezellen mit leerem pYES2/CT war keine Aktivität messbar.

3.4.2 Reinigung der SQR/His über eine NiNTA-Affinitätsmatrix

Da die Ausbeuten bei der Expression in *S. cerevisiae* deutlich geringer waren als bei *E. coli*, waren größere Kulturvolumina nötig, um ausreichende Mengen SQR/His für die biochemische Charakterisierung zu erhalten. Eine typische Reinigung ging von 4 Litern Expressionskultur aus, nach deren Aufschluss zunächst die Mitochondrien und anschließend die Membranen isoliert wurden. Durch Zugabe von 0,5 % (v/v) Triton X-100 konnte die SQR/His von der Membran gelöst und über den His-Tag von einer NiNTA-Affinitätssäule gebunden werden.

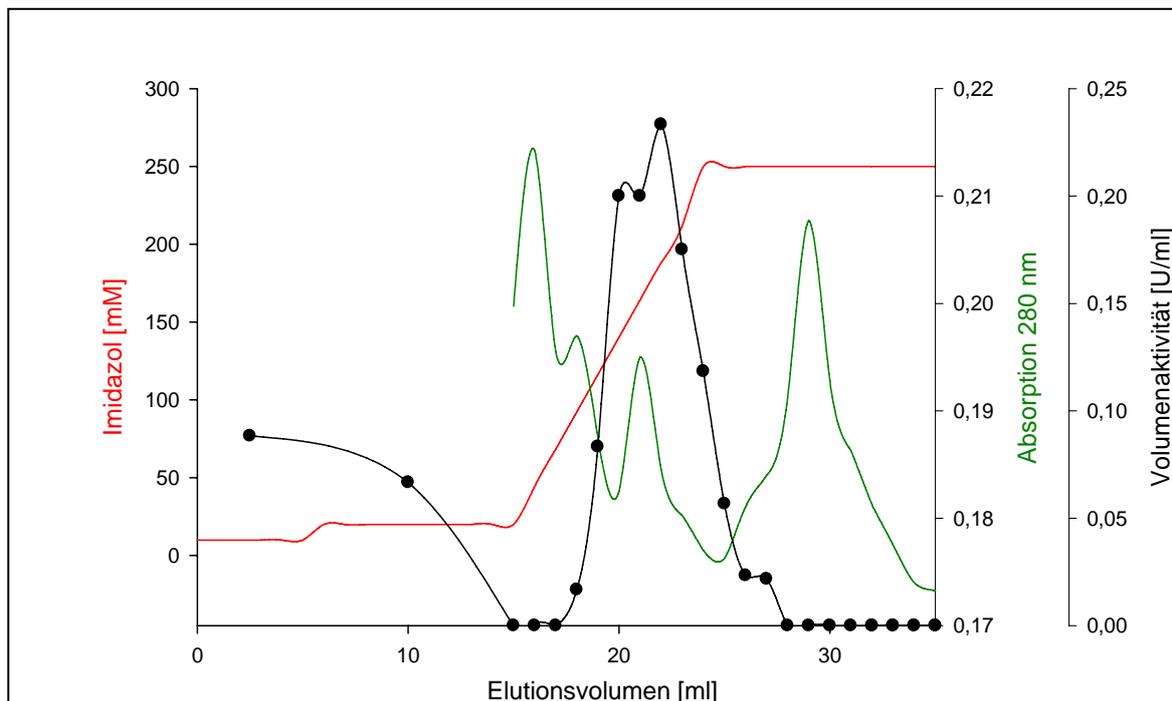


Abb. 3.7: **Elutionsprofil der 1,5 ml NiNTA-Säule.** Es wurden 5 ml solubilisierte Membranproteine aus 4 Litern Hefe mit einer Flussrate von 0,2 ml/min auf die Säule geladen. Es folgte ein Waschschrift mit einer Flussrate von 0,5 ml/min und 20 mM Imidazol über 10 ml. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 20 - 250 mM Imidazol über 20 ml und einer Flussrate von 0,5 ml/min. Es wurden Fraktionen von je 1 ml gesammelt.

Abb. 3.7 zeigt ein typisches Elutionsprofil einer Reinigung der SQR/His über eine NiNTA-Säule. Die Hauptaktivität sammelt sich in 7 Fraktionen. Aufgrund der geringen Proteinmenge und der Absorption des Imidazols bei 280 nm sind keine deutlichen Proteinpeaks in diesen Fraktionen zu erkennen. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, über eine Filtrationseinheit konzentriert und in einen Solubilisierungspuffer ohne Imidazol umgepuffert. Es wurde $\frac{1}{2}$ Volumen Glycerin hinzugegeben, so dass die SQR/His bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden konnte. War im Durchfluss noch eine ausreichend hohe Volumenaktivität messbar ($>0,3\text{ U/ml}$ in 5 ml), wurde dieser erneut auf die NiNTA-Säule geladen. Der Er-

folg der Reinigung wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie- bzw. Silberfärbung, sowie durch einen Western Blot mit Immunodetektion des His-Tags überprüft. Abb. 3.8 zeigt eine 12 % SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. In Spur 6 und 7 ist eine SQR/His Bande bei 50 kDa zu erkennen. Es sind noch Verunreinigungen mit anderen Proteinen vorhanden. Da das Protein jedoch nur in geringen Mengen exprimiert wurde, und darüber hinaus schnell degradierte, wurde von weiteren Reinigungsschritten abgesehen. Auch in Abb. 3.9 ist eine deutliche SQR/His Bande bei 50 kDa in den Spuren 3 und 4 nach einer Silberfärbung zu erkennen. Nur in den Fraktionen nach der NiNTA-Reinigung war die SQR/His durch Coomassie- oder Silberfärbung nachweisbar. In den Mitochondrien und deren Membranen war ein Nachweis des His-Tags durch Immunodetektion erforderlich (Abb. 3.9, Spur 6 + 8).

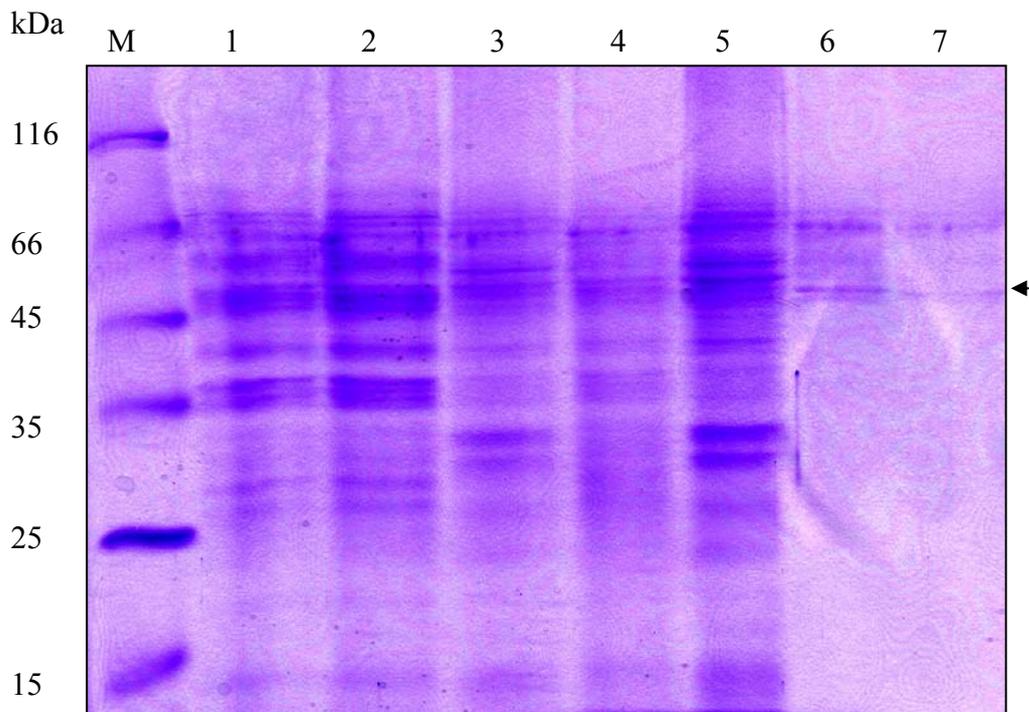


Abb. 3.8: **12 % SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung.** Aufgetragen sind die verschiedenen Fraktionen (jeweils 10 μ g) einer SQR/His-Reinigung aus *S. cerevisiae* INVSc1 transformiert mit pYES2/CT +SQR. M: Marker, 1: Rohextrakt, 2: PMS, 3: Mitochondrien, 4: lösliche Mitochondrienproteine, 5: Mitochondrienmembranproteine, 6: SQR/His nach 1. NiNTA, 7: SQR/His nach 2. NiNTA; der Pfeil kennzeichnet die SQR/His-Bande bei 50 kDa.

Die Proteinausbeuten sowie die spezifischen Aktivitäten verschiedener Präparationen unterlagen deutlichen Schwankungen. Abb.3.10 zeigt die spezifischen Aktivitäten von SQR/His gereinigt aus sechs unterschiedlichen Präparationen in $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, gemessen unmittelbar nach Konzentrierung der SQR/His über eine Filtrationseinheit und

Aufnahme in Solubilisierungspuffer ohne Imidazol und 50 % (v/v) Glycerin. Die spezifischen Aktivitäten lagen zwischen $1,5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ bis $5,2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

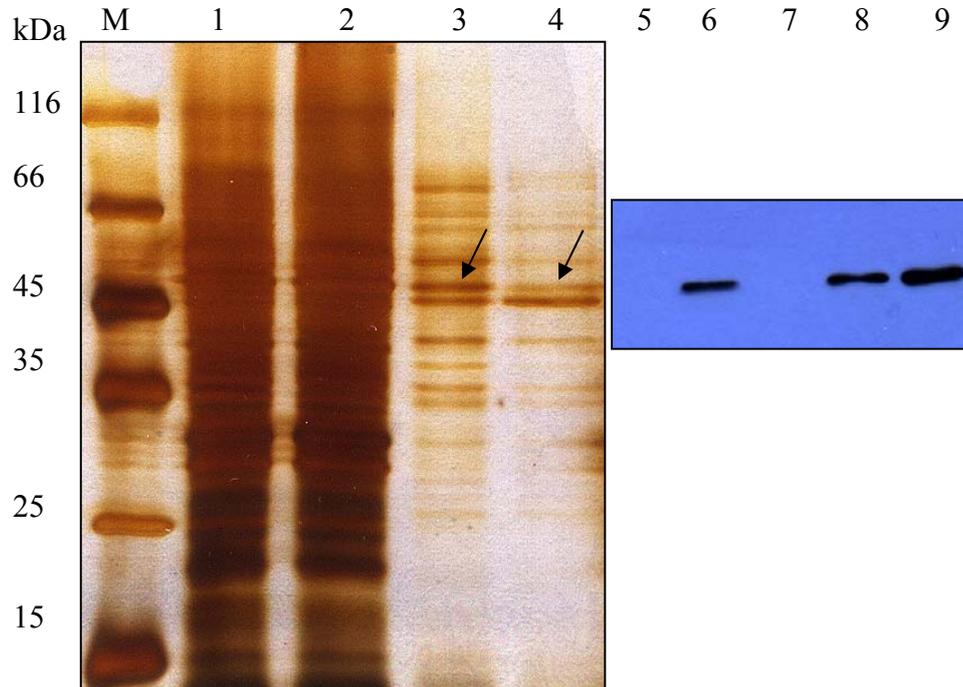


Abb. 3.9: **12 % SDS-PAGE nach Silberfärbung (1-4) sowie Western Blot (5-9) mit Immunodetektion des His-Tags.** Aufgetragen sind jeweils $10 \mu\text{g}$ Protein verschiedener Fraktionen einer SQR/His-Reinigung aus *S. cerevisiae* INVSc1 transformiert mit pYES2/Ct+SQR. M: Marker, 1: Mitochondrien, 2: Mitochondrienmembranen, 3: SQR/His nach 1. NiNTA, 4: SQR/His nach 2. NiNTA, 5: PMS, 6: Mitochondrien, 7: lösliche Mitochondrienproteine, 8: Mitochondrienmembranen, 9: SQR/His nach NiNTA. Die Pfeile kennzeichnen jeweils die SQR/His-Bande bei 50 kDa.

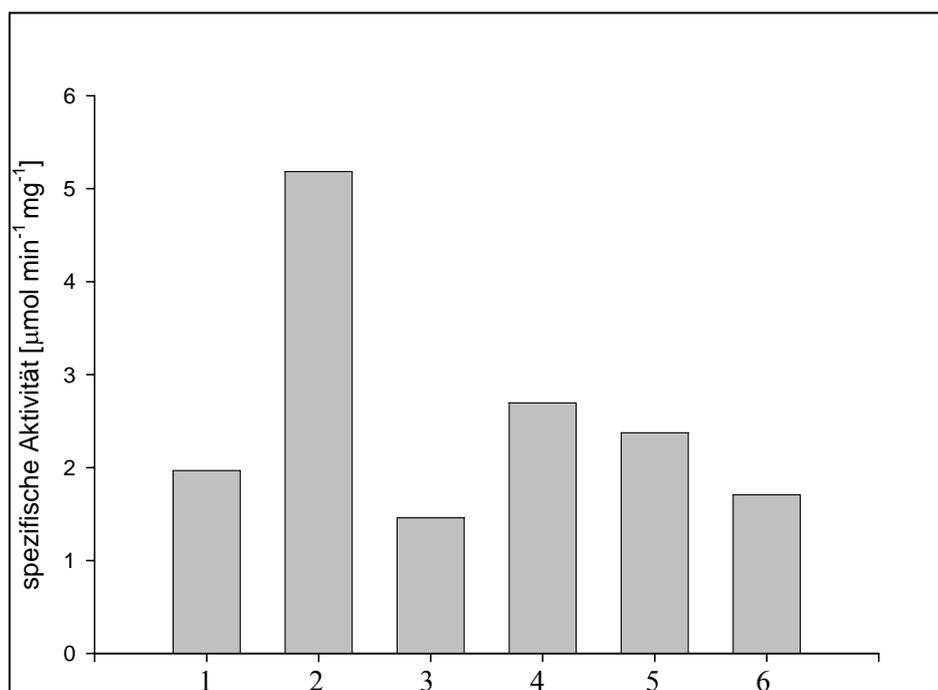


Abb. 3.10: **Spezifische Aktivitäten [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] NiNTA-gereinigter SQR/His aus sechs verschiedenen Präparationen (1-6).** Die gereinigte SQR lag in Solubilisierungspuffer ohne Imidazol mit 50 % (v/v) Glycerin vor.

3.5 Biochemische Charakterisierung der SQR/His

3.5.1 Cyanid-abhängige Aktivitätsmessung

3.5.1.1 K_m -Wert für Sulfid

Unter den eukaryotischen SQR-Enzymen wurde bislang nur die Substrataffinität der SQR aus der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* veröffentlicht (Vande Weghe und Ow 1999). Mit 2 mM Sulfid liegt dieser Wert um den Faktor 1000 höher als die für bakterielle SQRs veröffentlichten K_m -Werte (Griesbeck *et al.* 2000). Die Messungen der gereinigten SQR/His aus *Arenicola marina* exprimiert in *S. cerevisiae* ergaben einen K_m -Wert von 22,9 μM Sulfid. Es zeigte sich, dass die Aktivität der SQR/His durch Sulfidkonzentrationen höher als 200 μM deutlich gehemmt wurde. Der errechnete K_i -Wert lag bei 476,5 μM für Sulfid. Es wurde eine maximale Aktivität V_{max} von 5,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ errechnet. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe des „Enzyme Kinetics Module“ des Programms Sigma Plot unter Annahme einer nicht-kompetitiven Substrathemmung. Die graphische Darstellung nach Michaelis-Menten erfolgte ebenfalls mit diesem Programm (Abb. 3.11).

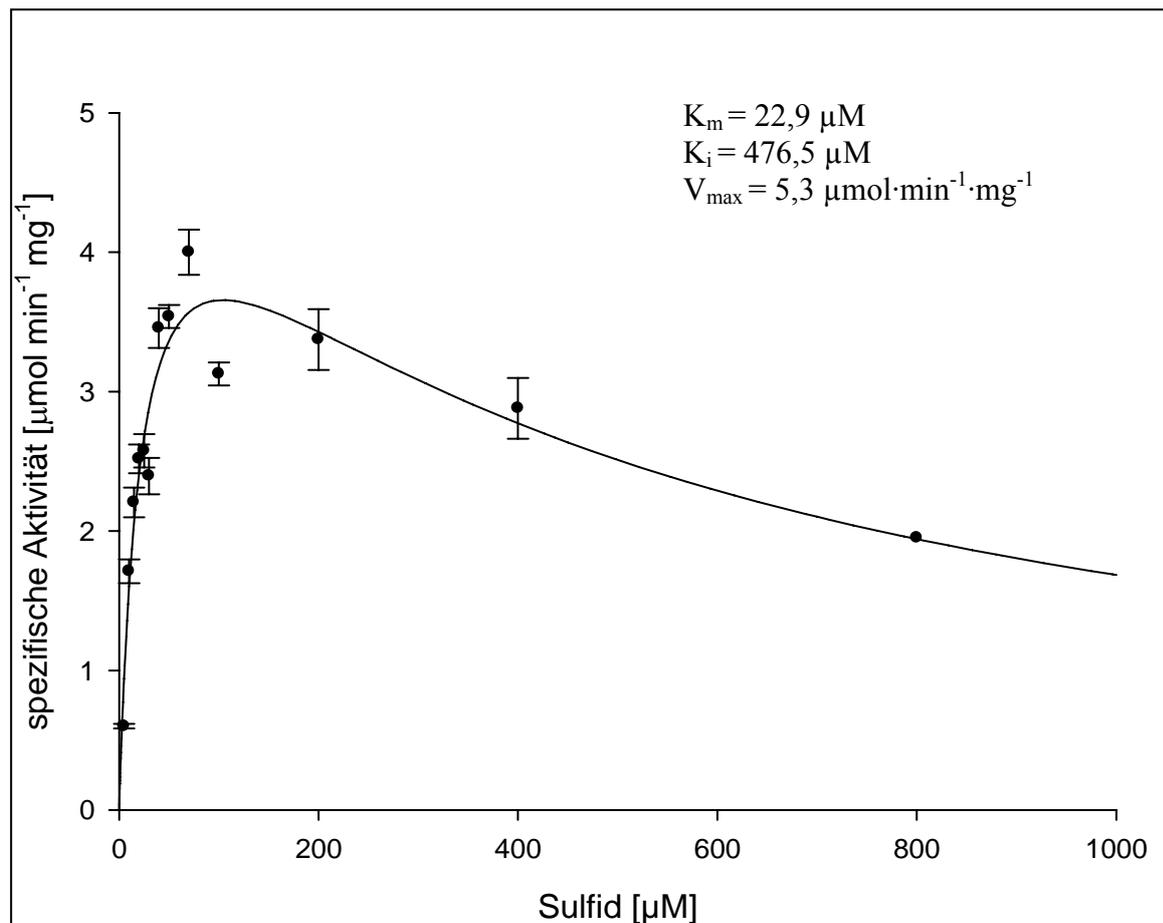


Abb. 3.11: **Substrataffinität der SQR/His gegenüber Sulfid.** Die Auftragung erfolgte mit Hilfe des „Enzyme Kinetic Module“ des Programmes Sigma Plot nach Michaelis-Menten unter Annahme einer nicht-kompetitiven Substrathemmung. Angegeben ist die spezifische Aktivität in $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1} \pm \text{SD}$ bei verschiedenen Sulfidkonzentrationen in μM . $n=3$, die Messungen erfolgten bei RT.

3.5.1.2 K_m -Wert für decyl-Ubichinon

Für die Aktivitätsbestimmungen der SQR/His wurde decyl-Ubichinon als exogener Elektronenakzeptor verwendet. Es besitzt im Gegensatz zu dem natürlich vorkommenden Ubichinon eine höhere Löslichkeit in Wasser. Vande Weghe und Ow (1999) verwendeten als Elektronenakzeptor Coenzym Q_2 , das auch von der SQR/His aus *Arenicola marina* als Substrat angenommen wurde (Daten nicht gezeigt), aufgrund der ebenfalls geringen Löslichkeit in Wasser jedoch nicht weiter verwendet wurde. Für Coenzym Q_2 konnten Vande Weghe und Ow (1999) einen K_m von 2 mM bestimmen. Bakterielle Sulfid:Chinon Oxidoreduktasen weisen hier einen K_m im mikromolaren Bereich auf (Griesbeck *et al.* 2000). Für die SQR/His aus *Arenicola marina* wurde ein K_m -Wert von 6,4 μM für decyl-Ubichinon ermittelt. Mit Hilfe des „Enzyme Kinetics Module“ des Programms Sigma Plot wurde eine maximale Aktivität V_{max} von 3,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ errechnet (Abb. 3.12).

3.5.1.3 K_m -Wert für Cyanid

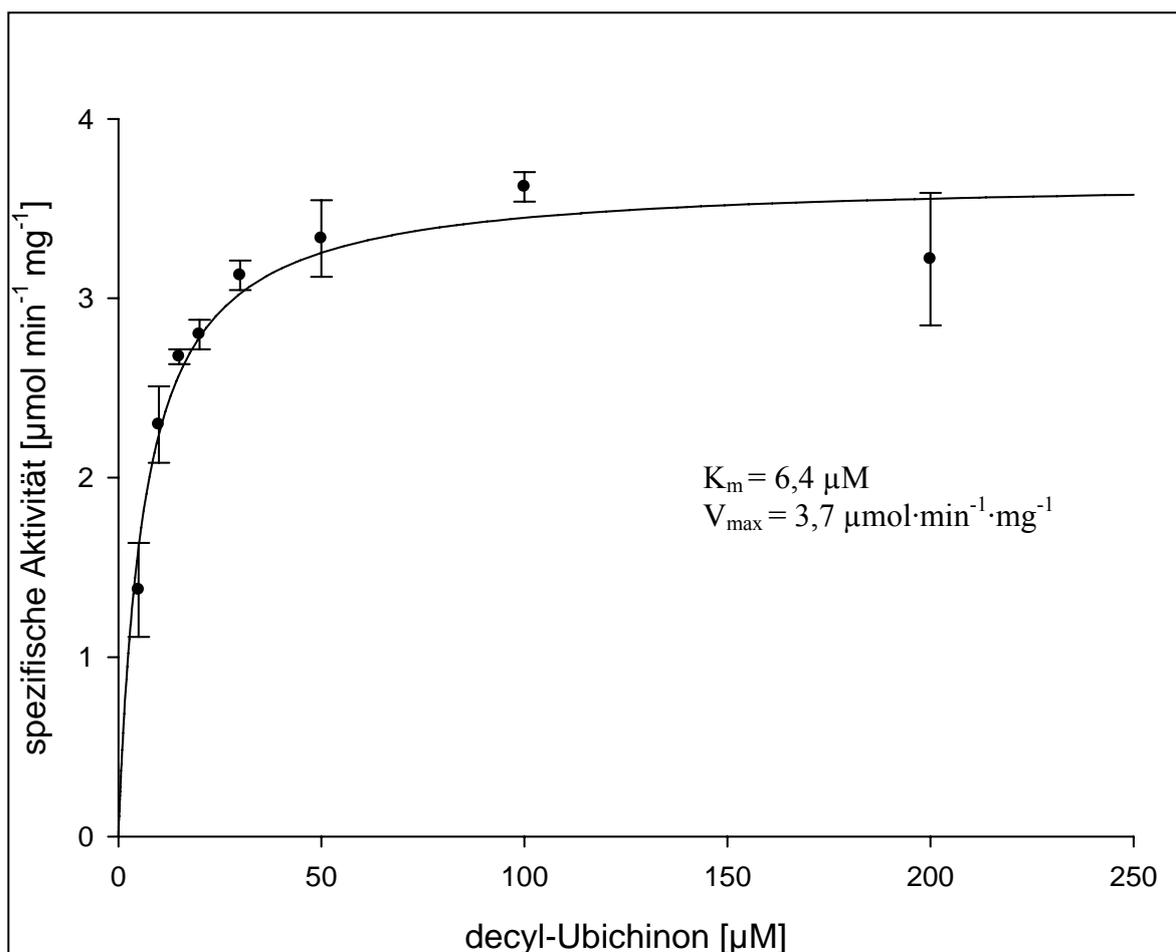


Abb. 3.12: **Substrataffinität der SQR/His gegenüber decyl-Ubichinon.** Die Auftragung erfolgte mit Hilfe des „Enzyme Kinetic Module“ des Programms Sigma Plot nach Michaelis-Menten. Angegeben ist die spezifische Aktivität in $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1} \pm \text{SD}$ bei verschiedenen dUQ-Konzentrationen in μM . $n=3$, die Messungen erfolgten bei RT.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die SQR/His des Wattwurms Cyanid als Cosubstrat verwendet. Ohne Cyanid war keine Aktivität nachweisbar. Aus diesem Grund wurde auch der K_m -Wert für Cyanid bestimmt. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des „Enzyme Kinetics Module“ des Programms Sigma Plot unter Annahme einer nicht-kompetitiven Substrathemmung. Es ergab sich ein K_m -Wert für Cyanid von 2,6 mM, die halbmaximale Hemmung der Aktivität wurde durch einen K_i von 0,7 mM angegeben. Es wurde eine theoretische maximale Aktivität V_{max} von $15,6 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ berechnet (Abb. 3.13).

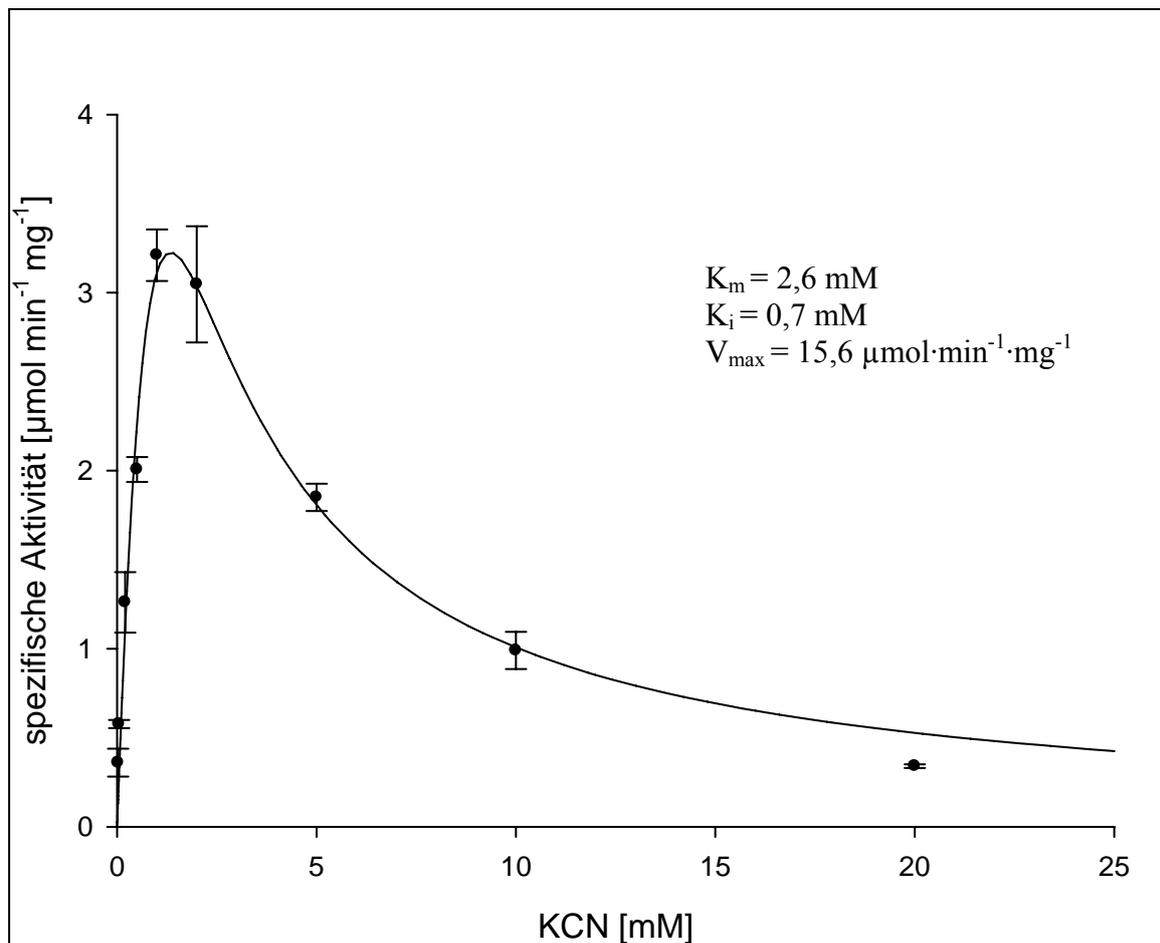


Abb. 3.13: **Substrataffinität der SQR/His gegenüber Cyanid.** Die Auftragung erfolgte mit Hilfe des „Enzyme Kinetics Module“ des Programms Sigma Plot nach Michaelis-Menten unter Annahme einer nicht-kompetitiven Substrathemmung. Angegeben ist die spezifische Aktivität in $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1} \pm \text{SD}$ bei verschiedenen Cyanid-Konzentrationen in mM. $n=3$, die Messungen erfolgten bei RT.

3.5.1.4 pH-Abhängigkeit der SQR/His-Aktivität

Für die Messung der pH-Abhängigkeit der Aktivität wurden sechs verschiedene Puffer ausgewählt, die einen pH-Bereich von 5,8 bis 11,1 abdeckten. Die Messungen erfolgten temperiert bei $22,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Bei dieser Temperatur wurde auch der pH-Wert der Puffer einge-

stellt. In Abb. 3.14 ist zu erkennen, dass die SQR/His-Aktivität ein Optimum bei einem pH-Wert von 9,0 aufweist. Bei einem pH-Wert unter 6 bzw. über 11 war keine Aktivität mehr messbar. Eine Abhängigkeit der Aktivität vom Puffer konnte bei den hier verwendeten Puffersubstanzen nicht beobachtet werden.

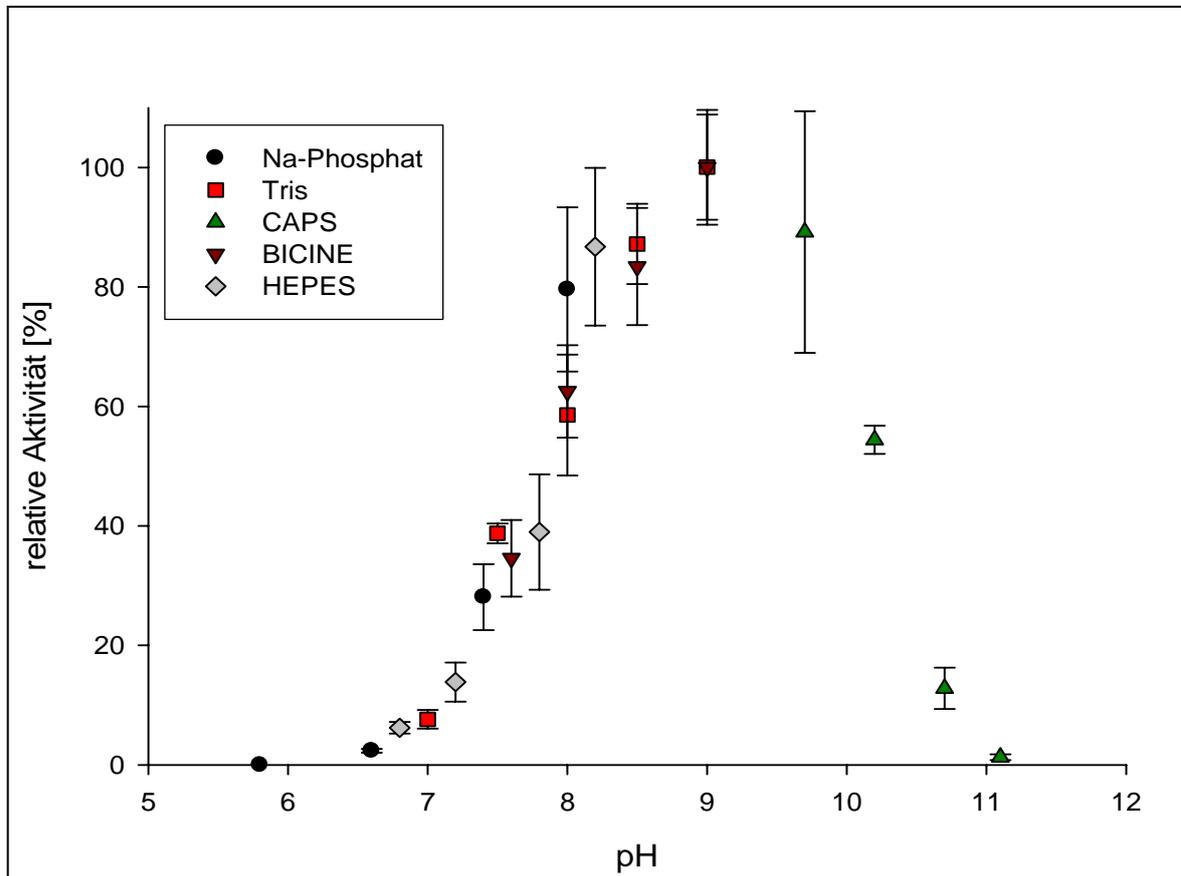


Abb. 3.14: **pH-Abhängigkeit der Aktivität der SQR/His.** Aufgetragen wurde die relative Aktivität bezogen auf die maximale Aktivität beim pH-Optimum bei verschiedenen pH-Werten in unterschiedlichen Puffern. Es wurde der Mittelwert aus drei Messungen \pm SD aufgetragen. Die maximale spezifische Aktivität bei pH = 9 betrug $5,6 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Die Messung erfolgte bei $22,5^\circ\text{C}$. Die Puffer lagen in einer Konzentration von 20 mM vor, Start der Reaktion erfolgte mit $200 \mu\text{M}$ Sulfid.

3.5.1.5 Hemmung der SQR/His-Aktivität durch Antimycin A

Antimycin A ist ein Chinon-Analogon und inhibiert Komplex III der mitochondrialen Atmungskette. Es wurde auch als Hemmstoff bakterieller Sulfid:Chinon Oxidoreduktasen beschrieben (Griesbeck *et al.* 2000). Abb. 3.15 ist zu entnehmen, dass Antimycin A auch die Aktivität der SQR/His des Wattwurms kompetitiv hemmt. Der K_m -Wert für dUQ bei einer ungehemmten Reaktion liegt bei $6,4 \mu\text{M}$ (siehe 3.4.1.2). In Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ Antimycin A erhöht er sich auf $8 \mu\text{M}$, bei einer Hemmstoffkonzentration von $50 \mu\text{M}$ liegt er bei $12,8 \mu\text{M}$.

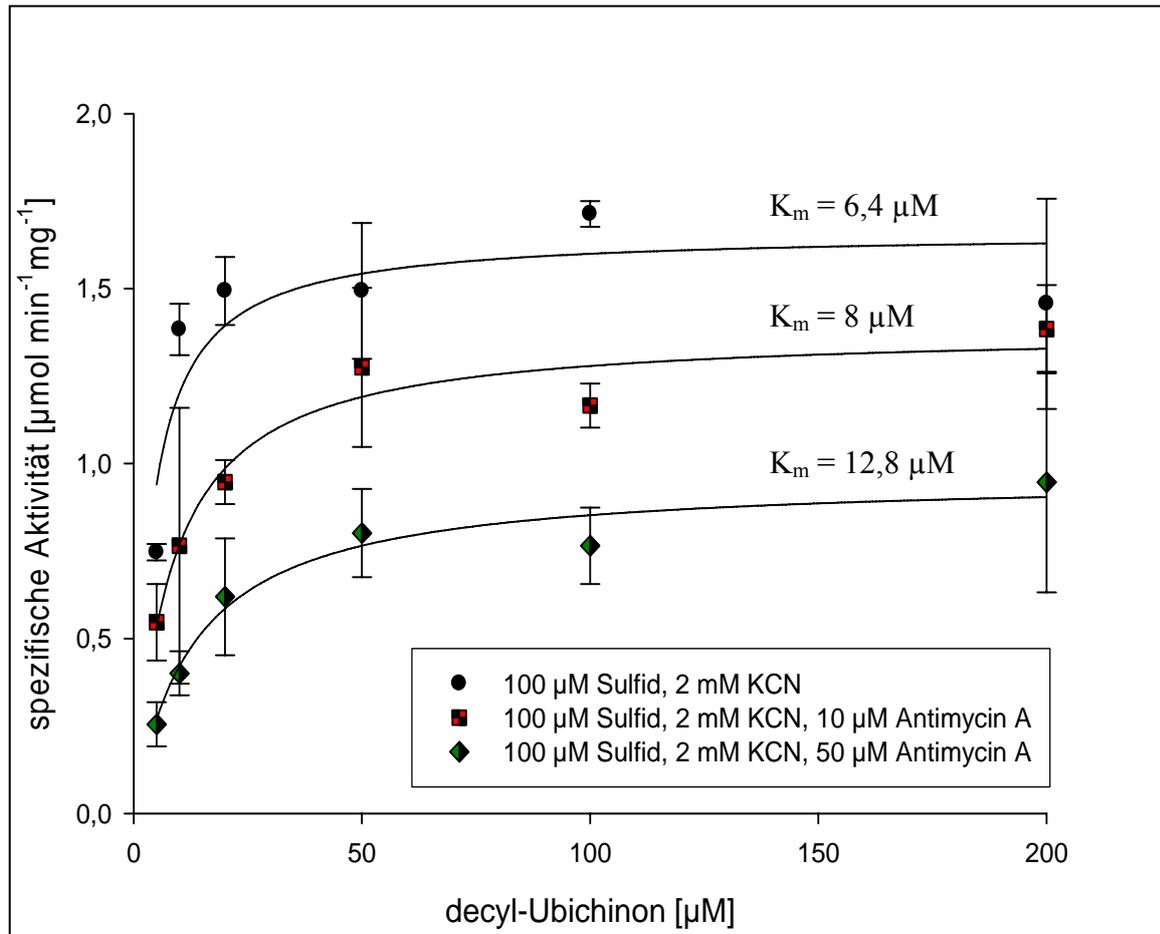


Abb. 3.15: **Hemmung der SQR/His Aktivität durch Antimycin A.** Aufgetragen ist nach Michaelis-Menten die spezifische Aktivität [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] \pm SD bei verschiedenen dUQ-Konzentrationen [μM] ohne, mit 10 μM und 50 μM Antimycin A. $n=3$, die Messungen erfolgten bei RT.

3.5.2 Thioredoxin-abhängige Aktivitätsmessung

Bei der Cyanid-abhängigen Aktivitätsmessung muss Cyanid in millimolaren Konzentrationen eingesetzt werden. Da Cyanid wie Sulfid als Atmungskettenhemmstoff wirkt, ist eine *in vivo* Funktion als SQR-Kosubstrat eher unwahrscheinlich. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach einem möglichen Ersatz-Kosubstrat für Cyanid gesucht. Es wurden verschiedene Substanzen getestet, darunter Glutathion red./ox., Sulfat, Sulfit, Thiosulfat, NO/HNO, Cystein und Cystein-S-Sulfat. Mit jedem dieser Substrate ohne weitere Zugaben außer Puffer, Ubichinon und Sulfid konnte jeweils keine Aktivität gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Das mitochondriale Enzym Rhodanase katalysiert die Übertragung eines Schwefelatoms von Thiosulfat auf Cyanid (Mintel und Westley 1966). Nandi, Horowitz und Westley (2000) berichteten über eine Thioredoxin-Reduktase-Aktivität der Rhodanase. Hierbei übernimmt reduziertes Thioredoxin die Rolle des Cyanids. In der vorliegenden Arbeit brachte nur die Zugabe von reduziertem Thioredoxin an-

stelle von Cyanid zum Reaktionsansatz zur Messung der SQR/His-Aktivität keinen Erfolg. Wurde zusätzlich Sulfit in millimolaren Konzentrationen zugefügt, war eine Aktivität messbar, die zwar nur 1/10 der Aktivität ausmachte, die mit Cyanid messbar war, sich aber als „echte“ Enzymaktivität herausstellte. Versuche ohne SQR/His, dUQ, Sulfid, Thioredoxin oder Sulfit zeigten, dass bei Fehlen einer dieser Substanzen keine Aktivität messbar war. In dem Reaktionsansatz waren außerdem noch Thioredoxin-Reduktase und NADPH zur Reduktion des Thioredoxins enthalten. Diese Substanzen waren nicht essentiell, steigerten die Aktivität jedoch geringfügig.

3.5.2.1 K_m -Wert für Sulfid

Die Affinität gegenüber Sulfid liegt bei der Thioredoxin-abhängigen Aktivitätsmessung mit einem K_m von $23,3 \mu\text{M}$ in der gleichen Größenordnung wie der K_m für Sulfid bei der Cyanid-abhängigen Aktivitätsmessung ($22,9 \mu\text{M}$, siehe 3.4.1.1).

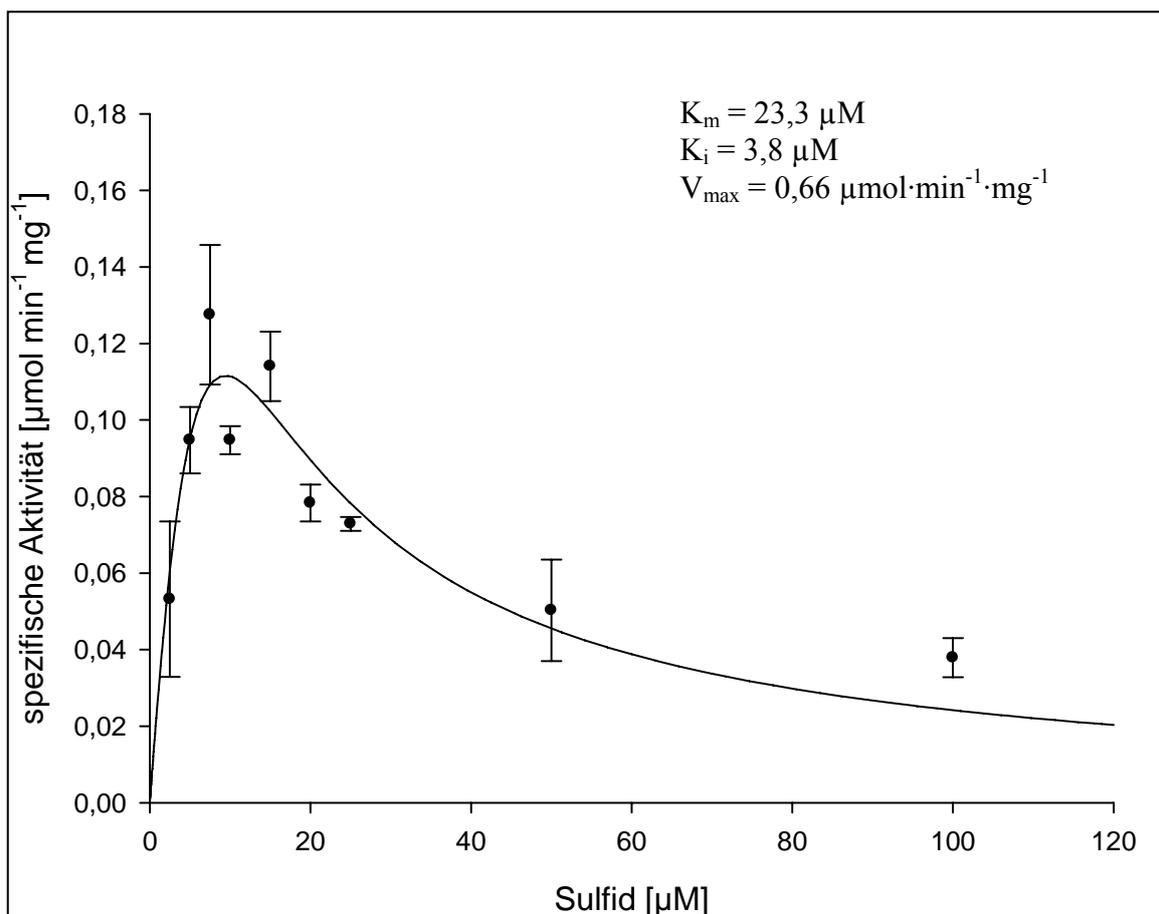


Abb. 3.16: **Substrataffinität der SQR/His gegenüber Sulfid.** Die Auftragung erfolgte mit Hilfe des „Enzyme Kinetic Module“ des Programms Sigma Plot nach Michaelis-Menten unter Annahme einer nicht-kompetitiven Substrathemmung. Angegeben ist die spezifische Aktivität in $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1} \pm \text{SD}$ bei verschiedenen Sulfidkonzentrationen in μM . $n=3$, die Messungen erfolgten bei RT. Im Ansatz enthalten waren 50 mM K-P_i, pH 8,2; 15 μM TRX; 0,2 U TRX-Red; 1 mM NADPH; 20 mM Sulfit.

Auffallend ist die stärkere Substrathemmung: Bereits bei einer Sulfidkonzentration von $3,8 \mu\text{M}$ ist die Reaktion halbmaximal gehemmt. Auch die errechnete maximale spezifische Aktivität V_{max} ist mit $0,66 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ um 1/10 geringer als V_{max} in Gegenwart von Cyanid. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe des „Enzyme Kinetics Module“ des Programms Sigma Plot unter Annahme einer nicht-kompetitiven Substrathemmung (Abb. 3.16).

3.5.2.2 K_m -Wert für Sulfit

Bei der Thioredoxin-abhängigen Aktivitätsmessung war nur bei Zugabe von Thioredoxin und Sulfit eine Aktivität messbar. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob eine Konzentrationsabhängigkeit besteht und der K_m -Wert für Sulfit des „Enzyme Kinetic Module“ des Programms Sigma Plot berechnet.

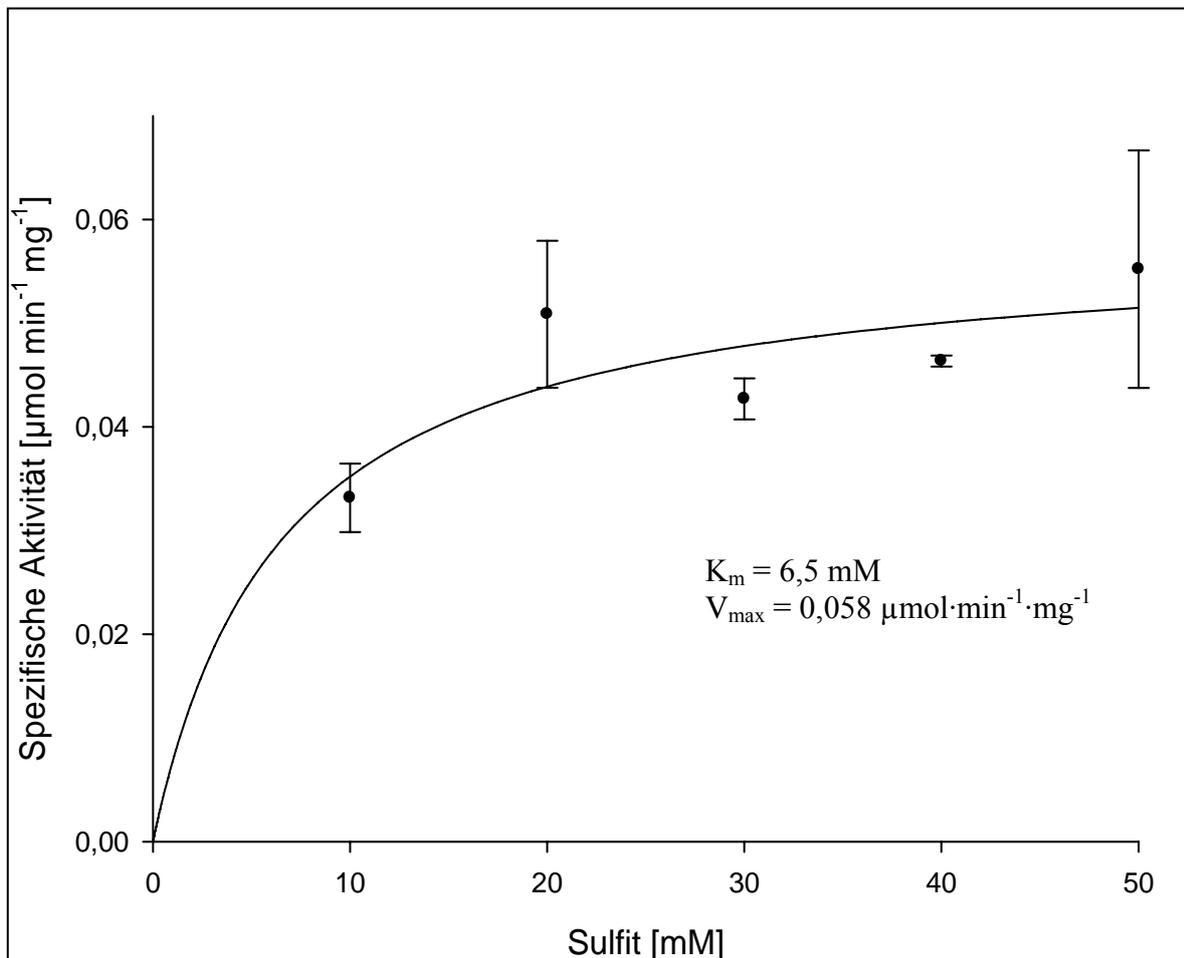


Abb. 3.17: **Substrataffinität der SQR/His gegenüber Sulfit.** Die Auftragung erfolgte mit Hilfe des „Enzyme Kinetics Module“ des Programms Sigma Plot nach Michaelis-Menten. Angegeben ist die spezifische Aktivität in $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1} \pm \text{SD}$ bei verschiedenen Sulfitkonzentrationen in mM. $n=3$, die Messungen erfolgten bei RT. Im Ansatz enthalten waren 50 mM K-P_i, pH 8,2; 15 μM TRX; 0,2 U TRX-Red; 1 mM NADPH; 20 μM Sulfid.

Nur wenn Sulfit in millimolaren Konzentrationen eingesetzt wurde, konnte Aktivität gemessen werden. Da die spezifische Aktivität in Abhängigkeit von Thio-redoxin ohnehin schon nur 1/10 der Cyanidaktivität betrug und an der Grenze des Messbaren lag, konnten keine Sulfitkonzentrationen geringer als 10 mM eingesetzt werden. Es wurde ein theoretischer K_m für Sulfit von 6,5 mM errechnet. Die maximale Aktivität V_{max} betrug $0,058 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

3.6 Bestimmung von Endprodukten

3.6.1 Messung von Thiosulfat, Sulfit und Sulfid mittels HPLC

Bereits seit 1992 wurde Thiosulfat als das Hauptprodukt der Entgiftung von Sulfid beim Wattwurm *Arenicola marina* diskutiert (Völkel und Grieshaber 1992; 1994). Es wurde postuliert, dass ein Sulfid-oxidierendes Enzym ähnlich der bakteriellen SQR Sulfid in Gegenwart von Sauerstoff zu Thiosulfat oxidiert (Völkel und Grieshaber 1996). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Elektronen des Sulfids in die mitochondriale Atmungskette einfließen und zur ATP-Synthese genutzt werden (Völkel und Grieshaber 1997). Um nachzuweisen, ob Thiosulfat tatsächlich das Endprodukt der SQR des Wattwurms ist, wurden Reaktionsansätze (2.11.6.1) mittels HPLC auf Thiosulfat untersucht. Ein weiteres mögliches Oxidationsprodukt von Sulfid wäre Sulfit, welches auch durch HPLC nachgewiesen werden sollte. Zusätzlich wurde der Verbrauch von Sulfid mit dieser Methode untersucht.

Abb. 3.18 zeigt die Thiosulfatkonzentration, die in Ansätzen mit und ohne SQR/His drei Minuten nach Zugabe verschiedener Sulfidkonzentrationen gemessen wurde. Es konnte sowohl im Ansatz mit SQR/His als auch im Kontrollansatz ohne Enzym Thiosulfat nachgewiesen werden. Nach Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Sulfid betrug die Thiosulfatkonzentration nach 3 Minuten im Ansatz mit SQR/His $7,8 \pm 0,8 \mu\text{M}$, im Kontrollansatz $7,8 \pm 1,5 \mu\text{M}$. Wurden $100 \mu\text{M}$ Sulfid hinzugegeben, lagen die Konzentrationen bei $17,2 \pm 4,2 \mu\text{M}$ im Ansatz mit Enzym bzw. $16,7 \pm 2,1 \mu\text{M}$ im Kontrollansatz. Thiosulfatkonzentrationen von $25,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$ im SQR/His-Ansatz und $25,6 \pm 8,6 \mu\text{M}$ im Kontrollansatz konnten 3 Minuten nach Zugabe von $200 \mu\text{M}$ Sulfid nachgewiesen werden. Es sind keine signifikanten Unterschiede in der Thiosulfatkonzentration zwischen Kontrollen und Ansätzen mit SQR/His erkennbar.

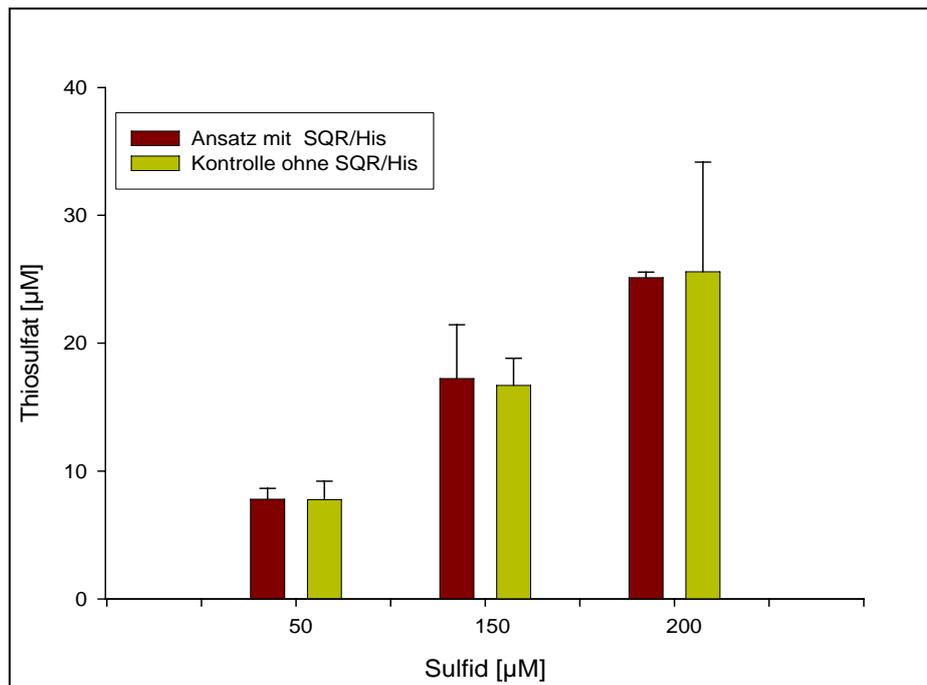


Abb. 3.18: Aufgetragen ist die Thiosulfatkonzentration [µM] ± SD im Reaktionsansatz nach 3-minütiger Inkubation mit 50, 150 und 200 µM Sulfid. Der Kontrollansatz (grün) enthielt keine SQR/His. n=3.

Die gemessenen Sulfidkonzentrationen sind in Abb. 3.19 dargestellt. Bei einer Zugabe von 50 µM Sulfid konnte nach 3 Minuten eine Sulfidkonzentration von $12,2 \pm 0,4$ µM im Ansatz mit SQR/His und $13,9 \pm 1,5$ µM im Kontrollansatz gemessen werden. Wurde die Reaktion mit 150 µM Sulfid gestartet, lagen die Konzentrationen bei $29,9 \pm 2,1$ µM im SQR/His-Ansatz und $29,8 \pm 2,1$ µM im Kontrollansatz. Bei einer Inkubation mit 200 µM Sulfid lagen die gemessenen Konzentrationen von Sulfid bei $42,9 \pm 0,04$ µM im Ansatz mit Enzym und $43,6 \pm 5$ µM im Kontrollansatz. Auch hier sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben mit SQR/His und den Kontrollen erkennbar.

In Abb. 3.20 ist die Sulfidkonzentration in Ansätzen mit SQR/His und den Kontrollen aufgetragen. Nach 3 Minuten und Zugabe von 50 µM Sulfid waren im Ansatz mit Enzym $0,5 \pm 0,7$ µM Sulfid nachweisbar, wohingegen es im Kontrollansatz $48 \pm 9,3$ µM waren. Wurden 150 µM Sulfid hinzugegeben, so lag die Sulfidkonzentration im SQR/His-Ansatz nach 3 Minuten bei 37 ± 9 µM und in den Kontrollproben bei 138 ± 21 µM. Bei einer Substratmenge von 200 µM Sulfid konnten nach 3 Minuten noch 100 ± 15 µM Sulfid im Enzymansatz nachgewiesen werden, während im Kontrollansatz eine Konzentration von 167 ± 24 µM Sulfid gemessen wurde.

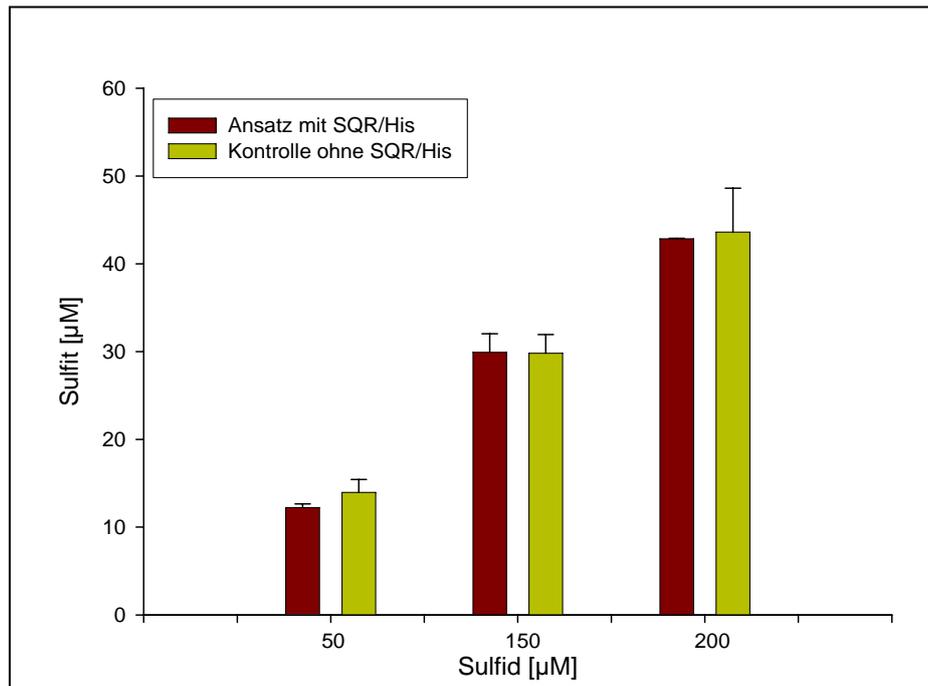


Abb. 3.19: Aufgetragen ist die Sulfitkonzentration [µM] ± SD im Reaktionsansatz nach 3-minütiger Inkubation mit 50, 150 und 200 µM Sulfid. Der Kontrollansatz (grün) enthielt keine SQR/His. n=3.

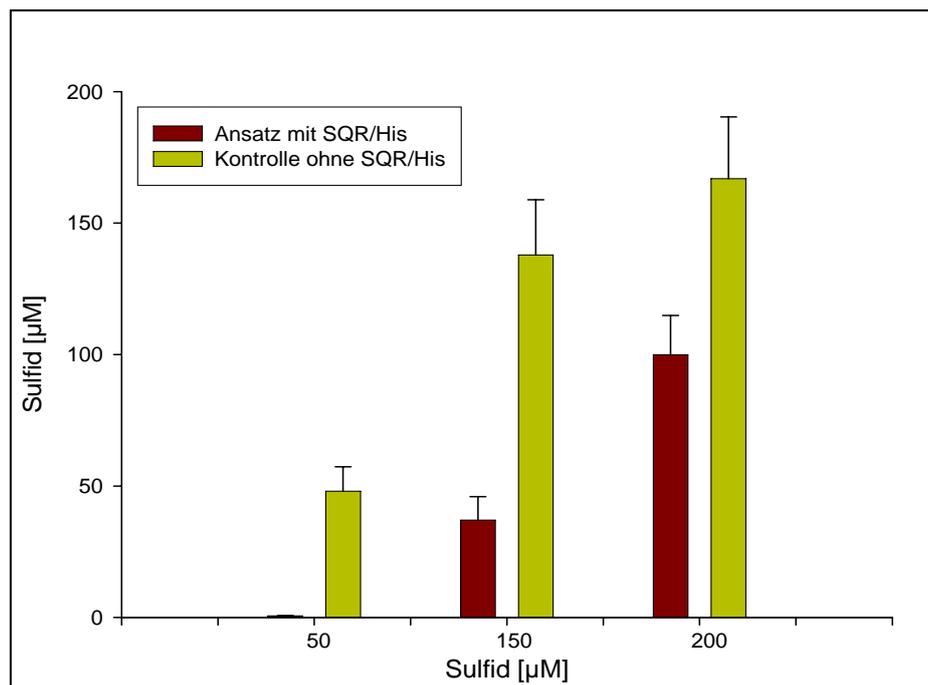


Abb. 3.20: Aufgetragen ist die Sulfidkonzentration [µM] ± SD im Reaktionsansatz nach 3-minütiger Inkubation mit 50, 150 und 200 µM Sulfid. Der Kontrollansatz (grün) enthielt keine SQR/His. n=3.

Bei den Sulfidkonzentrationen ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Ansätzen mit Enzym und den Kontrollansätzen zu erkennen.

3.6.2 Nachweis von Thiocyanat

Ein mögliches Endprodukt der SQR/His-Reaktion in Gegenwart von Cyanid war in Analogie zur Rhodanase-katalysierten Reaktion Thiocyanat.

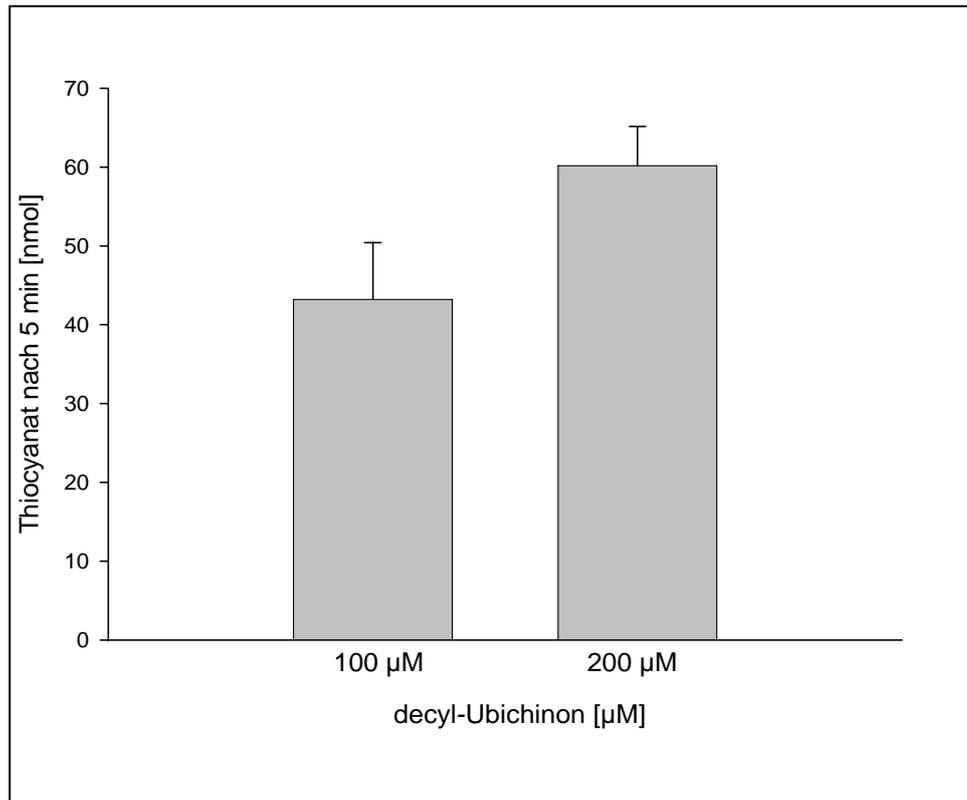


Abb. 3.21: Thiocyanat [nmol] in 1 ml Reaktionsansatz nach 5 min Inkubation mit 50 μM Sulfid in Gegenwart von 100 und 200 μM dUQ. $n=3$, angegeben ist jeweils die Differenz aus Versuchs- und Kontrollansatz.

Dieses Produkt entsteht durch Übertragung eines Schwefelatoms auf Cyanid. SQR/His-Reaktionsansätze (siehe 2.6.11.1) wurden wie unter 2.11.9 beschrieben behandelt und der Thiocyanatgehalt [nmol] photometrisch bestimmt. Es wurden Kontrollansätze (siehe 2.11.9) hergestellt und ebenfalls der Thiocyanatgehalt photometrisch bestimmt. Die Differenz aus Kontroll- und Versuchsansatz ist in Abb. 3.21 dargestellt. In Gegenwart von 100 μM dUQ konnten 5 min nach Zugabe von 50 μM Sulfid $43,2 \pm 7,2$ nmol Thiocyanat nachgewiesen werden, in Gegenwart von 200 μM dUQ waren es $60,2 \pm 5$ nmol.

3.7 Sequenzspezifische Mutagenese

Der Mechanismus der bakteriellen SQR aus *Rhodobacter capsulatus* wurde von Griesbeck *et al.* (2002) beschrieben. Mutationen der fünf „Fingerpint“-Aminosäuren Cys127Ser, Cys159Ser, Cys353Ser, His131Ala, His196Ala und Val300Asp führte zum Verlust oder deutlicher Verringerung der spezifischen Aktivität und zu Änderungen in der Substrataffinität. Drei dieser „Fingerprints“ konnten auch in eukaryotischen SQRs identifiziert werden (siehe 3.2). Die beiden konservierten Cysteine befinden sich bei der SQR aus *Arenicola marina* an den Positionen 208 und 386. Sie wurden jeweils gegen ein Serin ausgetauscht. In Abb. 3.22 sind weitere unter eukaryotischen SQRs konservierte Aminosäuren dargestellt. Darunter sind die beiden Histidine 86 und 299, die, wie auch das konservierte Glutamat an Position 159, jeweils zu Alanin mutiert wurden.

	Hi s86Al a	Gl u159Al a	Cys208Ser
Maus	HFYQPI WT	GLPEGF--AYPK	PVKCAGAPQKI M
Mensch	HFYQPI WT	GLPEGF--AHPK	PVKCAGAPQKI M
Areni col a	HYYQLWLT	GLPEAFD-VDPS	PI KCAGAPQKI M
Drosophi l a	HYYQPMFT	GLVEALETPDSN	PI KCAGAPQKI A
Anophel es	HYYQPMFT	GLLEALSIPNGK	PVKCPGAPQKVL
Pombe	HYYQPGWT	GLTEALDDPNTF	VLKCAGAPQKI M
	*:***:*	* *:	:**.*****
	Hi s299Al a	Asp342Val	Cys386Ser
Maus	LHVTPPMSAP	GI GDCTNLPTSK	TSCPLVTGYNR
Mensch	LHVTPPMSPP	GI GDCTNLPTSK	TSCPLVTGYNR
Areni col a	LHVPPMSTP	GI GDNTDI PTAK	TSCPLVTSKNT
Drosophi l a	LHVTPPMSTP	AI GDSASSPNSK	SSCPI VTGYSS
Anophel es	LHVTPPMGAP	AI GDCSSSPNSK	ASCPLVTGYNT
Pombe	LHAVPSMRSH	AI GDCSGLPTSK	TSCPLLTYGK
	** * . .	::** . *:*	::***:.. .

Abb. 3.22: **Alignments der Bereiche um die sechs konservierten Aminosäuren, die mutiert wurden.** Dargestellt ist ein Auszug aus dem kompletten Alignment. Die Positionen der konservierten Aminosäuren beziehen sich auf die Position in der SQR aus *Arenicola marina*. Maus: *Mus musculus*; Mensch: *Homo sapiens*; *Arenicola*: *Arenicola marina*; *Drosophila*: *Drosophila melanogaster*; *Anopheles*: *Anopheles gambiae*; *Pombe*: *Schizosaccharomyces pombe*.

Das in allen eukaryotischen SQRs konservierte Aspartat 342 in der FAD-Bindedomäne wurde gegen Valin ausgetauscht, da bei den bakteriellen SQRs diese Aminosäure an der entsprechenden Position vorliegt.

Die Mutationen wurden wie unter 2.12 beschrieben durchgeführt. Es wurden 1 Liter Hefe-Expressionskulturen angezogen und wie unter 2.9.5 und 2.9.6 beschrieben Mitochondrien und Membranen isoliert. Die Aktivität wurde in den Mitochondrien und den Membranen sowohl in Gegenwart von Cyanid (2.6.11.1) als auch mit Thioredoxin (2.6.11.2) bestimmt. Es war bei allen mutierten SQRs keine Aktivität messbar. Um den Erfolg der Expression zu überprüfen, wurden Western Blots mit Immunonachweis des His-Tags durchgeführt (Abb. 3.23). Wie in der Abbildung zu erkennen ist, wurden alle mutierten SQRs vollständig in der Hefemitochondrienmembran exprimiert.

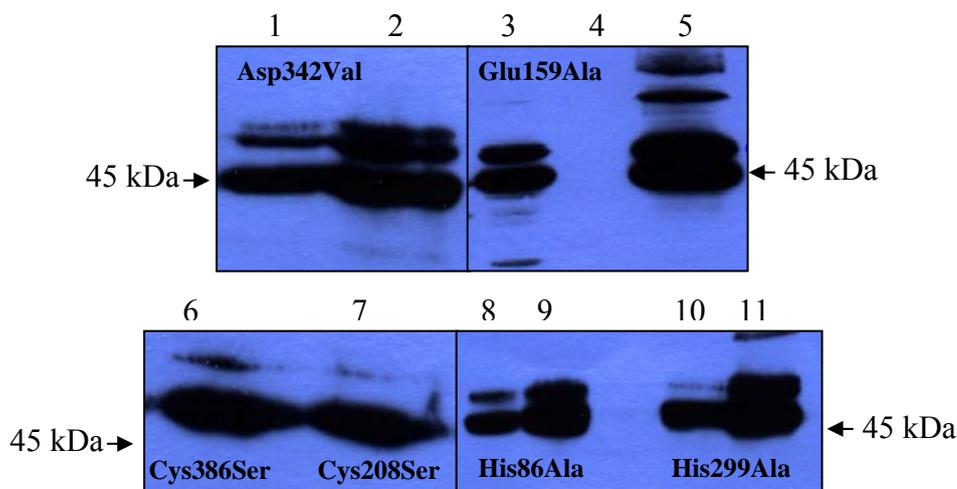


Abb. 3.23: Western Blot mit Immunonachweis des His-Tags der mutierten SQRs in pYES2/CT exprimiert in INVSc1. Asp342Val: 1: Mitochondrien; 2: Mitochondrienmembranen; Glu159Ala: 3: Mitochondrien, 4: lösliche Mitochondrienproteine, 5: Mitochondrienmembranen; Cys386Ser: 6: Mitochondrienmembranen; Cys208Ser: 7: Mitochondrienmembranen; His86Ala: 8: Mitochondrien, 9: Mitochondrienmembranen; His299Ala: 10: Mitochondrien, 11: Mitochondrienmembranen. Die Pfeile kennzeichnen die 45 kDa-Bande des Markers.

3.8 Phylogenetische Analyse der SQR

Die phylogenetische Analyse wurde mit 45 OTUs (Operational taxonomical units; Sequenzen) durchgeführt. Die im ClustalW-Alignment identifizierten SQR-Familien I, II und III (3.2) lassen sich auch im NeighborNet (NNet) Netzwerk (Abb. 3.24) erkennen. Die eukaryotischen Sequenzen fallen mit Ausnahme der Pilze *Aspergillus fumigatus* und *Schizosaccharomyces pombe* sowie des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* zusammen. In der NNet-Analyse spiegelt sich die geringe Konservierung der SQR-Sequenzen wider (3.2): Im Gegensatz zu baumartigen Darstellungen phylogenetischer Beziehungen, in denen jeweils nur das stärkste Signal wiedergegeben wird, zeigen Netzwerke auch alternative Topologien auf. So werden widersprüchliche Signale als „Splits“ durch parallele Linien dargestellt.

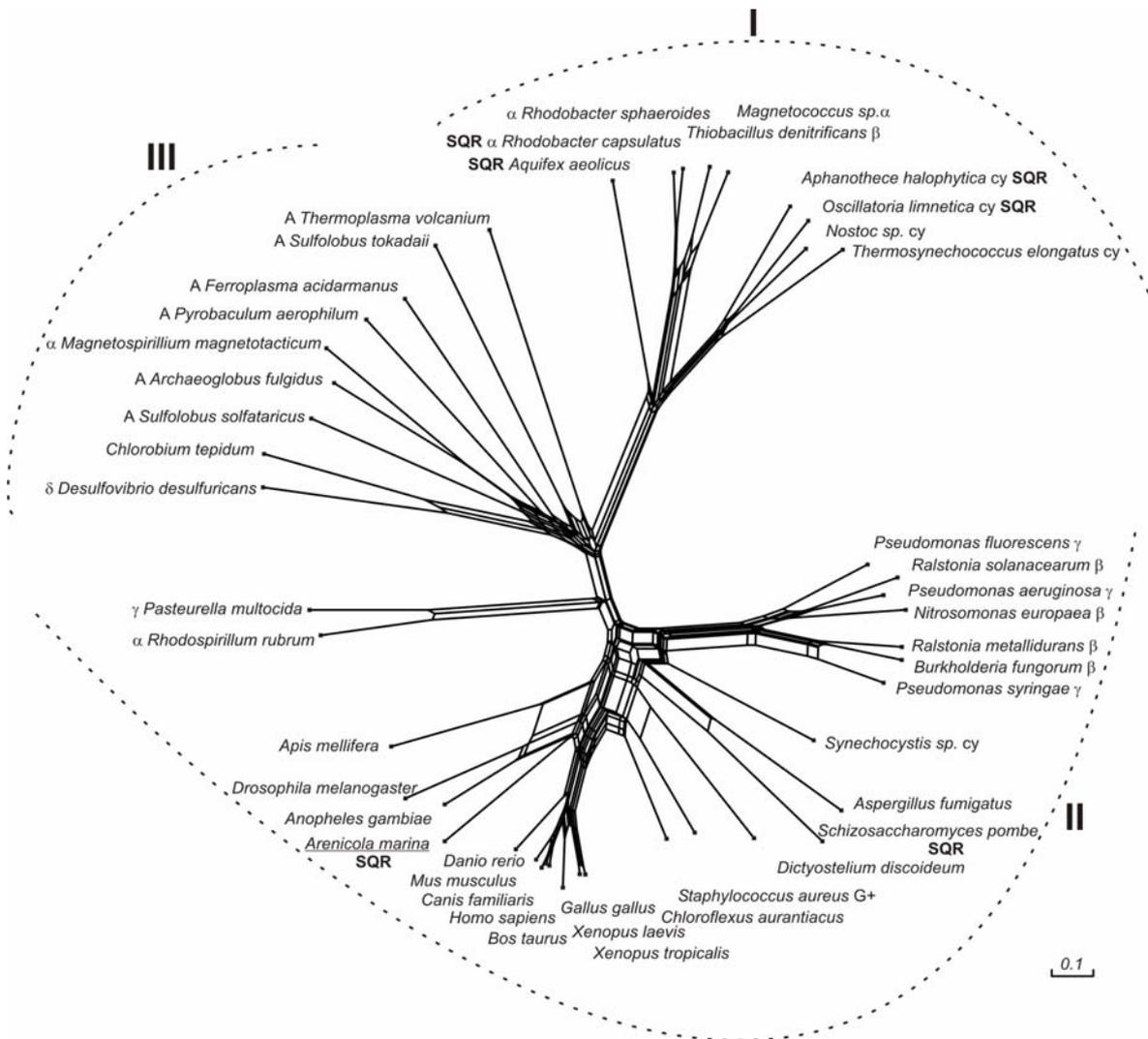


Abb. 3.24: **Phylogenetische NeighborNet (NNet)-Analyse der SQR-Sequenzen.** Die auf Sequenzähnlichkeiten basierenden SQR-Familien I, II und III sind gekennzeichnet. Für mit „SQR“ bezeichnete Sequenzen wurde biochemisch SQR-Aktivität nachgewiesen. Für Eubakterien ist die Taxonbezeichnung angegeben: α, β, γ, δ- Proteobakterien; cy: Cyanobakterien; G+: Gram-positiv. Archaeobakterien sind mit A gekennzeichnet. Der Skalierungsbalken steht für 0,1 Austausch pro Aminosäure. Die Zugangsnummern der Sequenzen sind im Anhang angegeben.

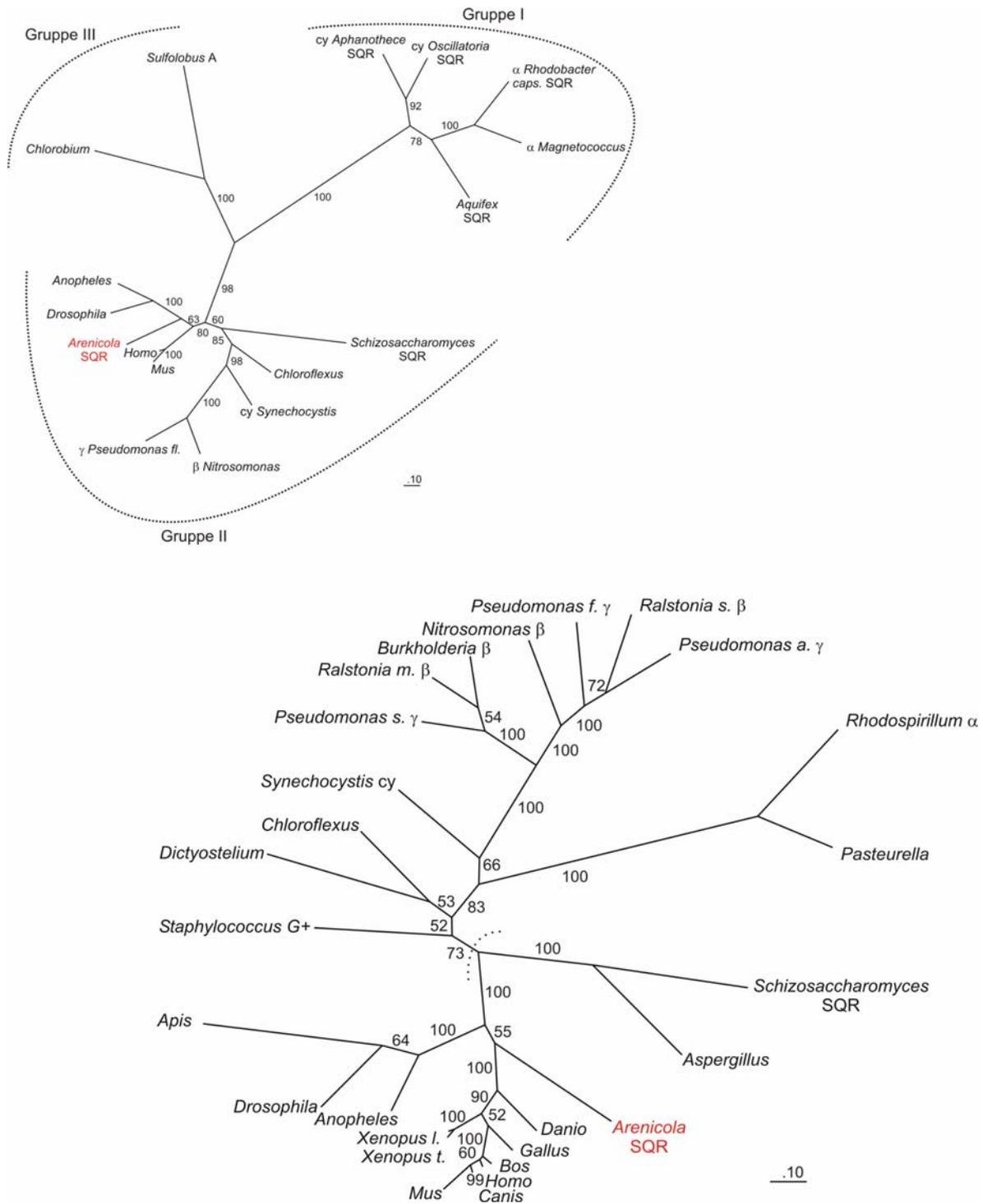


Abb. 3.25: **Phylogenetische ProtML-Bäume für ausgewählte SQR-Sequenzen.** Oben: ProtML-Baum mit Angabe von Bootstrap-Werten für einige Vertreter der SQR-Familien I-III. Unten: ProtML-Baum mit Bootstrap-Werten für SQR-Sequenzen der Gruppe II. Für mit „SQR“ bezeichnete Sequenzen wurde biochemisch SQR-Aktivität nachgewiesen. Für Eubakterien ist die Taxonbezeichnung angegeben: α , β , γ , δ -Proteobakterien; cy: Cyanobakterien; G+: Gram-positiv. Archaeobakterien sind mit A gekennzeichnet. Der Skalierungsbalken steht für 0,1 Austausch pro Aminosäure. Die Zugangsnummern der Sequenzen sind im Anhang angegeben.

Zusätzlich zu der NNet-Analyse wurden ProtML-Bäume erstellt. Abb. 3.25 zeigt oben die Phylogenie einiger SQR-Sequenzen der Gruppen I-III. Die Gruppen I und III haben jeweils eine Bootstrapunterstützung von 100 %, während Gruppe II zu 98 % unterstützt wird. Der untere Baum in Abb. 3.25 zeigt die Phylogenie der Gruppe II. Die gepunktete Linie trennt die eukaryotischen SQR-Sequenzen von den prokaryotischen dieser Gruppe. Die Bootstrapunterstützung für diese Trennung beträgt 73 %. Die SQR-Sequenz des Schleimpilzes *Dictyostelium* fällt hier nicht mit den anderen eukaryotischen Sequenzen zusammen, mit einem Bootstrapwert von 53 % gruppiert sie mit *Chloroflexus*. Hiervon getrennt wird die Sequenz aus *Staphylococcus* mit einer Bootstrapunterstützung von 52 %. Von den Proteobakterien werden die eukaryotischen Sequenzen zusammen mit *Chloroflexus* und *Staphylococcus* bei einem Bootstrapwert von 83 % getrennt.

4. Diskussion

Die Sulfidtoleranz verschiedener mariner Invertebraten ist schon seit vielen Jahren Gegenstand biologischer Untersuchungen. Bereits 1970 wurde von Fenchel und Riedl eine Reihe von Tiergruppen beschrieben, die im sulfidischen Milieu leben. Physiologische Untersuchungen deuteten immer mehr darauf hin, dass ein der bakteriellen Sulfid:Chinon Oxidoreduktase (SQR) ähnliches Enzym an der Entgiftung beteiligt sein könnte. Es gelang jedoch nicht, eine Gensequenz oder ein Protein aus einem sulfidadaptierten Invertebraten zu isolieren. 1999 wurde die erste eukaryotische SQR-Sequenz aus der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* bekannt (Vande Weghe und Ow), und es konnte gezeigt werden, dass das Enzym auch in anderen nicht sulfid-adaptierten Organismen vorkommt.

4.1 Isolierung des *sqr*-Gens aus *Arenicola marina*, heterologe Expression und Reinigung der SQR

4.1.1 Isolierung des *sqr*-Gens

Das Gen für die Sulfid:Chinon Oxidoreduktase aus *Arenicola marina* konnte durch heterologe Plaque-Hybridisierung mit einer Sonde aus *Drosophila melanogaster* isoliert werden. Der cDNA-Klon (A22-1), der das vollständige offene Leseraster enthielt, hatte eine Länge von 3317 Basenpaaren. Nur 1377 Basenpaare kodierten das Leseraster für die SQR, den verbleibenden 1940 Basenpaaren konnte kein offenes Leseraster zugeordnet werden. Das theoretische Molekulargewicht der Wattwurm-SQR von 51 kDa entspricht den für bakterielle SQRs ermittelten Molekulargewichten von 48 bis 55 kDa überein (zusammengefasst in Griesbeck, Hauska und Schütz 2000). Der theoretische isoelektrische Punkt beträgt 9,1. Membrangebundene Proteine sind typischerweise aufgrund ihrer hydrophoben Umgebung eher basisch.

Völkel und Grieshaber (1994) konnten zeigen, dass die Sulfidoxidation beim Wattwurm in den Mitochondrien stattfindet. Ebenso konnten Vande Weghe und Ow (1999) zeigen, dass das Sulfid-oxidierende Hmt2 der Spaltheife mitochondriell ist. So war zu erwarten, dass die SQR ebenfalls in den Mitochondrien lokalisiert ist und ein entsprechendes Transitpeptid besitzt. Die vorhergesagte Länge von 80 Aminosäuren ist nicht ungewöhnlich für Transitpeptide: In Säugern wurden Transitpeptide von bis zu 68, in Hefen sogar 121 Aminosäuren nachgewiesen (Schneider *et al.* 1998).

4.1.2 Heterologe Expression der SQR in *E. coli* und *S. cerevisiae*

Um zu überprüfen, ob die isolierte Sequenz eine funktionelle Sulfid:Chinon Oxidoreduktase kodiert, wurde das Protein zunächst in *E. coli* heterolog exprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit ist es jedoch nicht gelungen, aktive SQR (Aktivität bedeutet hier die Reduktion von decyl-Ubichinon in Gegenwart von Sulfid und 2 mM Cyanid; siehe 2.11.6.1) in *E. coli* zu exprimieren. Es wurde folglich die Expression in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* untersucht.

Die Expression der SQR aus dem Wattwurm erfolgte in der Hefe mit Hilfe des Vektors pYES2/CT, der das Anhängen von 6 Histidinen am C-Terminus ermöglichte. Die SQR konnte erfolgreich in *S. cerevisiae* exprimiert werden. Die isolierten Mitochondrien einer Präparation reduzierten decyl-Ubichinon nach Sulfidzugabe in Gegenwart von 2 mM KCN mit einer spezifischen Aktivität von $0,14 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, während die Mitochondrien aus Hefen mit unmodifiziertem Vektor keine Aktivität zeigten. Nach Aufschluss der Mitochondrien durch Ultraschallbehandlung und anschließender Ultrazentrifugation wurden die Membranen von den löslichen Mitochondrienproteinen getrennt. Die lösliche Proteinfraction zeigte keine SQR-Aktivität, wohingegen sich die spezifische Aktivität in den Membranen auf $0,22 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ steigerte.

4.1.3 Reinigung der SQR/His aus *S. cerevisiae*

Der C-terminale His-Tag der in Hefe exprimierten Wattwurm-SQR erlaubte eine einfache Reinigung der SQR/His über eine NiNTA-Affinitätschromatographie. Damit die Bindung an das Säulenmaterial erfolgen konnte, musste das Protein zunächst mit dem Detergens Triton X-100 von der Membran gelöst werden. Dabei waren deutliche Proteinverluste im Verlauf einer Reinigung zu erkennen, die auf Abbau durch Proteasen zurückzuführen sind. Die teilweise schlechte Nachweisbarkeit der SQR/His in Western Blots ist wahrscheinlich ebenfalls auf Proteasen zurückzuführen, die durch SDS aktiviert werden (Jones 1991; von Jagow, Link und Schägger 1994).

Aufgrund der Empfindlichkeit der SQR/His gegenüber Proteasen und/oder Abbau im Allgemeinen wurde auch trotz der Verunreinigungen, die sowohl durch Coomassie- als auch durch Silberfärbung im Gel in den Endprodukten noch zu erkennen waren (Abb. 3.8 und 3.9) von weiteren Reinigungsschritten abgesehen, die zu weiterem oder vollständigem Verlust des Proteins geführt hätten. Daher sind die in dieser Arbeit angegebenen spezifischen Aktivitäten für die gereinigte SQR/His niedrig und die tatsächliche spezifische Aktivität liegt vermutlich für das reine Enzym höher.

4.2 Spezifische Aktivität, Substrate, Substrataffinitäten und Sequenzvergleiche

4.2.1 Die Cyanid-abhängige Aktivität – wahrscheinlich ein Artefakt?

Um die Aktivität der SQR in Hefemitochondrien zu messen, wurden zur Hemmung der Cytochrom c Oxidase 2 mM Cyanid zum Reaktionsansatz gegeben (2.11.6.1). Es stellte sich jedoch heraus, dass auch das gereinigte Protein nur in Gegenwart von Cyanid aktiv ist. Dieser Effekt war zunächst verblüffend. Der Mechanismus der bakteriellen SQR ist mittlerweile aufgeklärt (Griesbeck *et al.* 2002), und alle bislang charakterisierten SQRs aus Bakterien benötigen außer Sulfid und einem Chinon keine weiteren Substrate. Auch die erste in der Literatur beschriebene eukaryotische SQR aus der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* katalysiert die Oxidation von Sulfid ohne zusätzliche Substrate (Vande Weghe und Ow 1999). Allerdings sind die sehr hohen K_m -Werte von 2 mM für Sulfid und Coenzym Q_2 auffallend. Für gereinigte bakterielle SQRs wurden K_m -Werte zwischen 2 und 8 μM für Sulfid bzw. 2 und 32 μM für Chinon bestimmt, was einem Faktor von 1000 zu den entsprechenden Werten der Hefe-SQR entspricht (zusammengefasst in Griesbeck, Hauska und Schütz 2000). In dieser Arbeit wurde für die SQR/His aus *Arenicola marina* in Gegenwart von 2 mM Cyanid ein K_m -Wert für Sulfid von 22,9 μM (3.5.1.1) und 6,4 μM für decyl-Ubichinon (3.5.1.2) bestimmt. Diese Werte liegen wie die bakteriellen Werte im mikromolaren Bereich. Dabei wird die Aktivität der SQR/His des Wattwurms bei einer Sulfidkonzentration von 476,5 μM bereits zur Hälfte gehemmt (Abb. 3.11). Bei dieser Substratkonzentration hat die eukaryotische SQR der Spaltheife mit einem K_m -Wert von 2 mM noch nicht ihre halbmaximale Aktivität erreicht. Über eine Substrathemmung durch Sulfid bei bakteriellen SQRs wurde bislang nicht berichtet, allerdings wurden nur Sulfidkonzentrationen bis zu 50 μM eingesetzt (z.B. Arieli *et al.* 1994; Schütz *et al.* 1997).

Eine Substrathemmung konnte auch für Cyanid beobachtet werden (Abb. 3.13). Bei einer Konzentration von 0,7 mM wird die SQR/His-Reaktion zur Hälfte gehemmt. Der K_m -Wert für Cyanid liegt bei 2,6 mM und ist damit extrem hoch, im Hinblick darauf, dass die Cytochrom c Oxidase der mitochondrialen Atmungskette bereits durch Konzentrationen von 10-50 μM Cyanid nahezu vollständig gehemmt wird (Jones *et al.* 1984). Da auch Sulfid in diesen Konzentrationen zu einer Hemmung der Cytochrom c Oxidase führt (Bagarinao und Vetter 1990; Grieshaber und Völkel 1998), würde es wenig Sinn machen, wenn ein Enzym wie die SQR, das als Hauptfunktion die Entgiftung von Sulfid haben soll, ein Kosubstrat erfordern würde, das selbst wiederum giftig ist und in einer Konzentration vorliegen muss, die um ein Vielfaches höher liegt als die Konzentration, bei der die Atmung bereits vollständig gehemmt ist.

Rhodanase (Thiosulfat:Cyanid Sulfurtransferase; E.C. 2.8.1.1) ist ein mitochondriales Enzym, das sowohl bei Bakterien als auch Eukaryoten vorkommt und *in vitro* den Transfer eines Sulfanschwefels (R-S-S) von Thiosulfat auf Cyanid katalysiert. Das Zwischenprodukt dieser Reaktion ist ein Cystein-gebundenes Persulfid, und es entstehen Sulfit und Thiocyanat als Endprodukte (Ploegman *et al.* 1978) (Abb. 4.2). Als *in vivo* Funktion der Rhodanase wird vielfach die Entgiftung von Cyanid beschrieben (Westley 1973; Westley *et al.* 1983; Nagahara, Ito und Minami 1999), wahrscheinlicher ist jedoch eher eine generelle Funktion als Sulfurtransferase, z.B. bei der Biosynthese von Molybdän-Kofaktoren (Matthies, Nimtz und Leimkühler 2005) oder Eisen-Schwefel-Zentren (Bagani, Bonomi und Cerletti 1984). Wie bereits erwähnt und in Abb. 4.2 dargestellt, entsteht bei der *in vitro* Reaktion der Rhodanase mit Cyanid als Endprodukt Thiocyanat. Auch bei der Cyanid-abhängigen SQR-Reaktion konnte in dieser Arbeit Thiocyanat nachgewiesen werden (3.6.2).

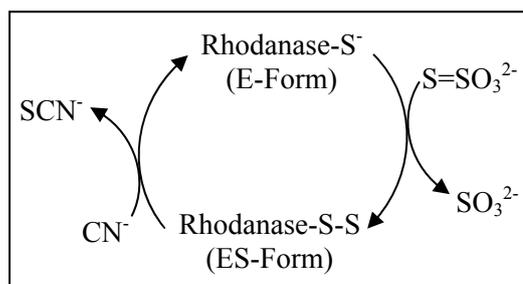


Abb. 4.2: **Schematische Darstellung der Rhodanase-Reaktion.** Die E-Form besitzt ein freies Cystein, auf das ein Schwefelatom von Thiosulfat übertragen wird. So entsteht die ES-Form, die das Schwefelatom auf Cyanid überträgt (nach Mintel und Westley 1966).

Wood beschrieb 1987 erstmals den spektrophotometrischen Nachweis von Thiocyanat von Sorbo (1953; 1957) als allgemeine Methode für die Quantifizierung von Sulfanschwefel. Sulfanschwefel ist labil und hochreaktiv. Mit einem Oxidationsstatus von 0 oder -1, gebunden an ein weiteres Schwefelatom, kann er leicht auf ein Nukleophil wie Cyanid (oder auch Sulfit (SO_3^{2-})) übertragen werden. Aufgrund der hohen Reaktivität mit Cyanid wird Sulfanschwefel oftmals auch als „Cyanolysierbarer Schwefel“ bezeichnet (zusammengefasst in Iciek und Wlodek 2001).

Vor kurzem beschrieben Shibata und Kobayashi (2006) ähnliches für die SQR aus *Pseudomonas putida*: Diese bakterielle Sequenz gehört wie die eukaryotischen SQRs zur Gruppe II, und die Autoren konnten zeigen, dass die Aktivität der gereinigten SQR nach Zugabe von 2 mM Cyanid von $1,2 \pm 0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ auf $138,2 \pm 0,9 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ gesteigert wurde. Auch in diesen Versuchen konnte Thiocyanat als Endprodukt nachgewiesen werden.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schließen, dass die SQR des Wattwurms cyanolysierbaren Schwefel enthält. Im Gegensatz zu den bereits charakterisierten

prokaryotischen SQRs, die zum Teil schon durch 10 μM Cyanid zur Hälfte gehemmt werden (zusammengefasst in Griesbeck, Hauska und Schütz 2000), ist Cyanid für die SQR des Wattwurms ein Kosubstrat, wenn auch mit geringer Affinität und einer nicht-kompetitiven Substrathemmung mit einem K_i von 0,7 mM (Abb. 3.13).

Ein anderer typischer SQR-Hemmstoff, das Chinon-Analogon Antimycin A, der die meisten prokaryotischen SQRs in mikromolaren Konzentrationen hemmt (zusammengefasst in Griesbeck, Hauska und Schütz 2000), hemmt auch die Wattwurm-SQR. In Abbildung 3.15 ist zu erkennen, dass sich der K_m für decyl-Ubichinon in Gegenwart von 10 μM Antimycin A von 6,4 μM auf 8 μM erhöht. Bei einer Hemmstoffkonzentration von 50 μM liegt er sogar bei 12,8 μM . In Bezug auf die Interaktion mit Ubichinon unterscheidet sich die Wattwurm-SQR demnach wahrscheinlich nicht von der bakteriellen SQR (Gruppe I), so dass die Bezeichnung „Sulfid:Chinon Oxidoreduktase“ zutreffend ist.

4.2.2 Thioredoxin als möglicher Schwefelakzeptor

Nandi und Westley (1998; siehe auch Nandi, Horowitz und Westley 2000) konnten zeigen, dass die Rhodanase aus Rinderleber eine Thioredoxin-Oxidase-Aktivität besitzt. Auch für das Enzym aus *E. coli* konnte eine Interaktion mit Thioredoxin nachgewiesen werden (Ray *et al.* 2000). Hierbei wurde reduziertes Thioredoxin (reduziert durch Thioredoxin-Reduktase in Gegenwart von NADPH) zum Reaktionsansatz gegeben, der Rhodanase und Thiosulfat enthielt. Die Übertragung des Schwefels konnte indirekt über die Oxidation von NADPH und die gleichzeitige Freisetzung von Sulfid gezeigt werden.

Eine sulfidabhängige Reduktion von decyl-Ubichinon durch die SQR/His des Wattwurms konnte durch Zugabe von reduziertem Thioredoxin nicht gemessen werden. Da eine Freisetzung von Sulfid, wie sie für die Rhodanase-katalysierte Reaktion beschrieben wurde, wenig Sinn machen würde, muss der nun am Thioredoxin gebundene Sulfanschwefel auf einem anderen Weg abgelöst werden, um Thioredoxin wieder verfügbar zu machen.

Da die Rhodanase wie die SQR in den Mitochondrien lokalisiert ist, wäre eine Rhodanase-katalysierte Reaktion von Thioredoxin-Persulfid mit Sulfid zu Thiosulfat und Thioredoxin (die Rückreaktion der Rhodanase) denkbar gewesen. Es war tatsächlich Aktivität messbar, jedoch war es nicht notwendig, Rhodanase in den Reaktionsansatz zu geben. Waren Thioredoxin (15 μM) und Sulfid in Konzentrationen über 10 mM vorhanden, konnte eine Reduktion von Ubichinon nach Zugabe von Sulfid gemessen werden (3.5.2). Allerdings betrug die spezifische Aktivität nur etwa 1/10 der Aktivität, die in Gegenwart von Cyanid gemessen werden konnte. Die Affinität gegenüber Sulfid ist mit einem errech-

Cyanid gemessen werden konnte. Die Affinität gegenüber Sulfid ist mit einem errechneten K_m -Wert von 23,3 μM (Abb. 3.16) ähnlich dem für die Cyanid-abhängige Reaktion (22,9 μM , Abb. 3.11). Allerdings wird die Thioredoxin-abhängige Reaktion schon bei einer Sulfidkonzentration von 3,8 μM zur Hälfte gehemmt, in Gegenwart von Cyanid war die halbmaximale Hemmung erst bei etwa 480 μM Sulfid erreicht. Bei dieser Konzentration konnte bereits keine Thioredoxin-abhängige Aktivität mehr gemessen werden.

Da die Thioredoxin-abhängige SQR/His Aktivität auch ohne Rhodanase zu messen war, wird der Sulfanschwefel zunächst von der SQR auf Thioredoxin und dann von Thioredoxin auf Sulfit übertragen. Letztere ist – analog zur Cyanolyse – eine rein chemische Reaktion. Auch der hohe K_m -Wert für Sulfit (6,5 mM, Abb. 3.17) deutet eher auf eine nicht-enzymatische Reaktion hin. Problematisch war in diesem Versuchsansatz die Tatsache, dass Sulfit in millimolaren Konzentrationen die Disulfidbrücke des oxidierten Thioredoxins spalten kann (Sulfitolyse) und ein enzymatisch inaktives S-Sulfonyl Derivat entsteht (Würfel, Häberlein und Follmann 1993). Diese Reaktion trat wahrscheinlich als Konkurrenz zur SQR-Reaktion auf. Wurde zunächst Sulfid in den Reaktionsansatz gegeben, und vor der Zugabe von Sulfit einige Minuten inkubiert, konnte die Aktivität für wenige Sekunden um das 2-3 fache gesteigert werden (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der niedrigen Aktivität und somit geringen Produktkonzentration, sowie der hohen Instabilität von Persulfiden war es nicht möglich, Thioredoxin-Persulfid im Rahmen dieser Arbeit nachzuweisen. Aufgrund der hohen Sulfitkonzentrationen im Ansatz war ein Nachweis von Thiosulfat durch HPLC ebenfalls kaum aussichtsreich.

Ob Thioredoxin tatsächlich das *in vivo* Substrat der SQR ist, bleibt noch zu klären. Die spezifischen Aktivitäten sind sehr gering. Allerdings wurde in dieser Arbeit Thioredoxin aus *E. coli* verwendet. Es wäre daher interessant, die Aktivität der Wattwurm-SQR in Gegenwart von Wattwurm-Thioredoxin zu bestimmen. Aber auch aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich schließen, dass die SQR wahrscheinlich wie die Rhodanase Schwefel sowohl auf Cyanid als auch auf Thioredoxin übertragen kann. Die SQR besitzt demnach eine Sulfurtransferaseaktivität, im Unterschied zur Rhodanase überträgt sie jedoch gleichzeitig die Elektronen des Sulfids auf Ubichinon und kann zur ATP-Produktion in den Mitochondrien beitragen.

Der grundlegende Unterschied zwischen der SQR aus Gruppe I und der Wattwurm-SQR, die zu Gruppe II gehört, ist also ein drittes Substrat (z.B. Cyanid, Thioredoxin), das die zuletzt genannte für ihre Reaktion erfordert. Diese Erkenntnis legt einen zur bakteriellen SQR unterschiedlichen Mechanismus nahe.

4.2.3 Fingerprints und Konservierung der SQR

Auch bei Betrachtung der Sequenzen fallen Unterschiede zwischen den eukaryotischen SQRs und den bereits charakterisierten bakteriellen SQRs auf. So konnten nur drei der von Griesbeck *et al.* (2002) beschriebenen SQR-Fingerprints in allen Sequenzen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.2). Mit der Verwendung der Terminologie von Griesbeck *et al.* (2002) sind das die SQR-Fingerprints 2 mit Cys 159, und 5 mit Cys 353, sowie die FAD-Bindedomäne III mit einem konservierten Glycin an Position 299 in der *Rhodobacter*-SQR. Auch die zwei weiteren FAD-Bindedomänen I und II von Proteinen der Glutathion-Reduktase Familie (nach Wierenga *et al.* 1986; Eggink *et al.* 1990; van Driessche *et al.* 1996) konnten in allen Sequenzen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Bei der Analyse von sieben prokaryotischen SQRs konnten Griesbeck *et al.* (2002) zwei weitere Fingerprints identifizieren, Cys 127 und His 296, die jedoch nicht in allen Sequenzen konserviert waren, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Bei Betrachtung des Alignments in Abb. 3.2 fällt auf, dass die umgebenden Aminosäuren der Fingerprints Cys 159, Gly 299 und Cys 353 unterschiedliche Muster zeigen, die eine Gruppierung der Sequenzen erlauben (Theissen *et al.* 2003). Die Sequenzen der bereits ausführlich beschriebenen bakteriellen SQRs aus z.B. *Rhodobacter* und *Aquifex* sind beide Vertreter der Gruppe I. Gruppe II umfasst sämtliche eukaryotische sowie einige bakterielle Sequenzen, von denen bislang nur für das Protein aus *S. pombe* (Vande Weghe und Ow 1999) und – im Rahmen dieser Arbeit – aus *Arenicola marina* SQR-Aktivität gezeigt werden konnte. In Gruppe III finden sich nur bakterielle Sequenzen, hauptsächlich Archaeobakterien, für welche noch keine SQR-Aktivität beschrieben wurde.

Basierend auf spektroskopischen Untersuchungen und gerichteter Mutagenese haben Griesbeck *et al.* (2002) einen Reaktionsmechanismus für die SQR vorgeschlagen. Hierbei sind sowohl die in allen Sequenzen konservierten Cysteine 127 und 353 involviert, jedoch auch das nur in Gruppe I vorhandene Cystein 159. Wurde dieses Cystein gegen ein Serin ausgetauscht, so konnten nur noch 0,5 % der Wildtypaktivität gemessen werden.

Die Beteiligung des dritten Cysteins an der Reaktion unterscheidet die SQR der Gruppe I von anderen Flavoproteinen der Glutathion-Reduktase Familie. Hierzu gehören z.B. die Glutathion-Reduktase, die Thioredoxin-Reduktase oder die Lipoamid-Dehydrogenase. Diese Enzyme besitzen zwei konservierte Cysteine, die den Elektronentransfer zwischen den Schwefelzentren und FAD vermitteln (Williams 1992). Ein drittes Cystein ist bei der Reaktion nicht beteiligt. Das Flavoprotein FCC besitzt ebenfalls zwei

Cysteine, die den SQR-Fingerprints 2 und 5 entsprechen, das dritte Cystein fehlt auch hier (Griesbeck *et al.* 2002).

Zusätzlich zu den sieben prokaryotischen SQRs der Gruppe I und dem bereits erwähnten FCC untersuchten Griesbeck *et al.* (2002) auch die SQR aus *S. pombe*, sowie die menschliche Glutathion-Reduktase und die Lipoamid-Dehydrogenase aus *Azotobacter vinelandii* auf die SQR-Fingerprints und stellten heraus, dass sich sowohl in der damals einzigen bekannten eukaryotischen SQR aus *S. pombe*, sowie in FCC und den Vertretern der Glutathion-Reduktase Familie (van Driessche *et al.* 1996) an der Position hinter dem konservierten Glycin 299 der FAD-Bindedomäne III ein konserviertes Aspartat befindet, wohingegen die bakteriellen SQRs aus Gruppe I an dieser Position ein konserviertes Valin aufweisen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sämtliche Vertreter der Gruppe I an dieser Position ein Valin besitzen (mit Ausnahme von *Thermosynechocystis*, dort befindet sich an der Position ein Isoleucin, siehe Abb. 3.2), und in allen SQR-Sequenzen aus Gruppe II und III Aspartat die entsprechende Aminosäure ist. Dieser Unterschied ist in Abb. 4.1 noch einmal dargestellt.

SQR (<i>Rhodobacter</i>)	GFVIVDQHQQNPTFKNVFAVGV \mathbf{V} CVAI	304
SQR (<i>Aquifex</i>)	KMVI \mathbf{V} NR \mathbf{C} FQNP \mathbf{T} YK \mathbf{N} IFG \mathbf{V} GV \mathbf{V} TAI	298
SQR (<i>Arenicola</i>)	YVTVKRETLQHTKYPNVFGIG \mathbf{D} NTDI	346
FCC (<i>Allochro\mathbf{m}atium</i>)	WCPVDIKTFESSIHKGIHVIG \mathbf{D} ACIA	328
GR (<i>Homo</i>)	GHIIVDEFQNT-NVKGIYAVG \mathbf{D} VCG-	377
TR (<i>Homo</i>)	GKIPVTDEEQT-NVPYIYAIG \mathbf{D} ILED	336
PDH (<i>Homo</i>)	AKSVVKQDRLLGLLMPFRAF \mathbf{G} \mathbf{D} VKFK	393

Abb. 4.1: ClustalW-Alignment der FAD-Bindedomäne III verschiedener Vertreter von Disulfid-Oxidoreduktase Flavoproteinen. Aligned wurden die SQR Sequenzen von *Rhodobacter capsulatus* (Gr. I), *Aquifex aeolicus* (Gr. I), *Arenicola marina* (Gr. II), FCC von *Allochro \mathbf{m} atium vinosum* sowie die Glutathion-Reduktase (GR), Thioredoxin-Reduktase (TR) und Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) des Menschen. Die Zugangsnummern der Sequenzen sind im Anhang angegeben.

Die geringen Substrataffinitäten der von Vande Weghe und Ow (1999) beschriebenen Hefe-SQR von 2 mM sowohl für Sulfid als auch für Ubichinon, ließen schon früh Zweifel aufkommen, ob dieses Protein tatsächlich *in vivo* Sulfid oxidiert (Nübel *et al.* 2000; Griesbeck *et al.* 2002). In diesem Zusammenhang wurde das fehlende Valin in der FAD-Bindedomäne III hervorgehoben. Griesbeck *et al.* (2002) haben das Valin in der *Rhodobacter*-SQR gegen Aspartat ausgetauscht und konnten nur noch 11 % der Wildtypaktivität messen. Dabei verringerten sich auch die Substrataffinitäten von 5 μ M auf über 400 μ M für Sulfid bzw. von 3 μ M auf über 28 μ M für decyl-Ubichinon. Doch auch diese Werte lagen immer noch um den Faktor 10 bzw. 100 niedriger als die für Hefe bestimmten

Werte. Des Weiteren betonten sie, dass auch FCC mit einem Aspartat an der entsprechenden Stelle einen niedrigen K_m von 12,5 μM für Sulfid aufweist (Cusanovich, Meyer und Bartsch 1991).

Die Kristallstrukturen einiger Vertreter der Glutathion-Reduktase Familie sind bereits aufgeklärt, darunter z.B. die Glutathion-Reduktase, die Lipoamid-Dehydrogenase und die p-Hydrobenzoat-Hydroxylase (Karplus und Schulz 1987; Schierbeek *et al.* 1989; Schreuder *et al.* 1988). Bei diesen Proteinen ist das konservierte Aspartat an der Wasserstoffbrückenbindung mit der Riboseuntereinheit des FAD beteiligt, und es liegt nahe, dass das bei allen Vertretern dieser Familie mit dem entsprechenden Aspartat der Fall ist.

4.3 Der Reaktionsmechanismus der mitochondrialen SQR

Sowohl die biochemischen Eigenschaften der Wattwurm-SQR, als auch die Sequenzunterschiede zu den bakteriellen SQRs lassen für die mitochondriale SQR einen anderen Reaktionsmechanismus vermuten, als für bakterielle SQRs bereits beschrieben wurde. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit sechs konservierte Aminosäuren der Wattwurm-SQR ausgetauscht, um einen Einblick in den Reaktionsmechanismus zu erhalten. Darunter waren die beiden Fingerprint-Cysteine 159 und 353 (siehe 3.2), die in der *Arenicola*-Sequenz an den Positionen 208 und 386 zu finden sind. Nach dem Austausch gegen Serin war keine SQR-Aktivität in isolierten Hefemitochondrienmembranen detektierbar. Auch der Austausch von zwei in der Gruppe II konservierten Histidinen (86 und 299) sowie des Glutamats 159 gegen Alanin führte zu einem Verlust der Aktivität. Das unter 4.1.1 hervorgehobene Aspartat in der FAD-Bindedomäne III wurde gegen Valin ausgetauscht, wonach keine Aktivität mehr messbar war.

Es kann aufgrund der fehlenden Aktivität bei allen Mutanten davon ausgegangen werden, dass die entsprechenden Aminosäuren eine katalytische Rolle spielen, genauere Aussagen über Veränderungen in den Substratspezifitäten sind jedoch nicht möglich. Da die spezifische Aktivität der gereinigten Wildtyp SQR/His gering ist, liegen die Aktivitäten der mutierten Enzyme wahrscheinlich unterhalb der Nachweisgrenze. Einige Rückschlüsse lassen sich dennoch aus den Mutationsversuchen ziehen.

4.3.1 Die reduktive Halbreaktion

Wie schon unter 4.1.1 angedeutet, bilden die beiden Cysteine vermutlich die Disulfidbrücke im aktiven Zentrum, an die Sulfid angreift. Ein solches Cysteinpaar ist charakteristisch für Disulfid-Oxidoreduktase Flavoproteine (Williams 1992). Abb. 4.4 zeigt den generellen

Mechanismus der Interaktion zwischen der Disulfid-Brücke des Enzyms und dem Dithiol-Substrat.

Die Substrate der gut charakterisierten Disulfid-Oxidoreduktase Flavoproteine wie z.B. der Thioredoxin-Reduktase, Glutathion-Reduktase oder Lipoamid-Dehydrogenase sind jeweils Dithiole. Im Gegensatz dazu besitzt das Substrat der SQR nur ein Schwefelatom. Griesbeck *et al.* (2002) vermuteten, dass das dritte konservierte Cystein in der bakteriellen SQR (Gruppe I) die Rolle des zweiten Schwefels übernehmen könnte. Da dieses Cystein der eukaryotischen SQR fehlt, muss die Disulfidbrücke zwischen Enzym und Substrat durch ein Nukleophil wie z.B. Cyanid *in vitro* oder aber durch ein Akzeptorprotein (Thioredoxin, Sulfurtransferasen) *in vivo* aufgelöst werden.

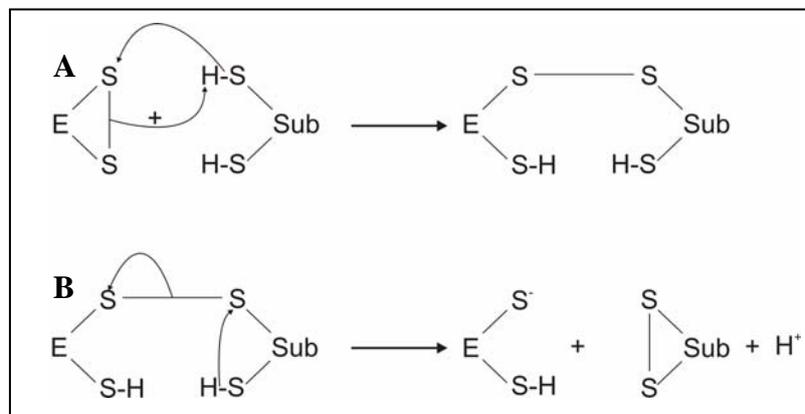


Abb. 4.4: **Generelle Reaktion der Disulfid-Oxidoreduktase Flavoproteine mit ihrem Dithiol-Substrat.** Durch das Substrat wird die Disulfidbrücke im Enzym reduziert und ein gemischtes Disulfid entsteht als Zwischenprodukt (A). Die zweite Thiolgruppe des Substrats löst durch einen nukleophilen Angriff die Disulfidbrücke. Es entsteht ein Enzym-Dithiol und ein Substrat-Disulfid (B) (Griesbeck *et al.* 2002). Bei der SQR kann diese typische Reaktion nicht stattfinden, da ihr Substrat (Sulfid) nur ein Schwefelatom enthält.

Zusätzlich zu einem Cysteinpaar ist eine basische Aminosäure im katalytischen Zentrum der Disulfid-Oxidoreduktasen erforderlich, die ein Proton von einem Cystein entfernt, wodurch ein Thiolat mit stärkerem nukleophilen Charakter entsteht. Bei der Glutathion-Reduktase (Pai und Schulz 1983) und Lipoamid-Dehydrogenase (Williams 1992) ist diese Base ein Histidin, bei der Thioredoxin-Reduktase ein Aspartat (Williams 1995). Bei der Sulfid-Dehydrogenase Flavocytochrom c (FCC) konnte anhand der Kristallstruktur gezeigt werden, dass die entsprechende Base im aktiven Zentrum ein Glutamat ist (Chen *et al.* 1994). In Homologie zu FCC identifizierten Griesbeck *et al.* (2002) ebenfalls ein Glutamat als Base im aktiven Zentrum. Da der Austausch des in eukaryotischen SQRs konservierten Glutamats zu einem Aktivitätsverlust der Wattwurm-SQR führte, handelt es sich

bei dieser Aminosäure vermutlich auch um die katalytisch aktive Base. In Anlehnung an den von Griesbeck *et al.* (2002) beschriebenen Mechanismus für die SQR aus *Rhodobacter capsulatus* ist ein Mechanismus wie in Abb. 4.5 dargestellt für die reduktive Halbreaktion der Wattwurm-SQR vorstellbar.

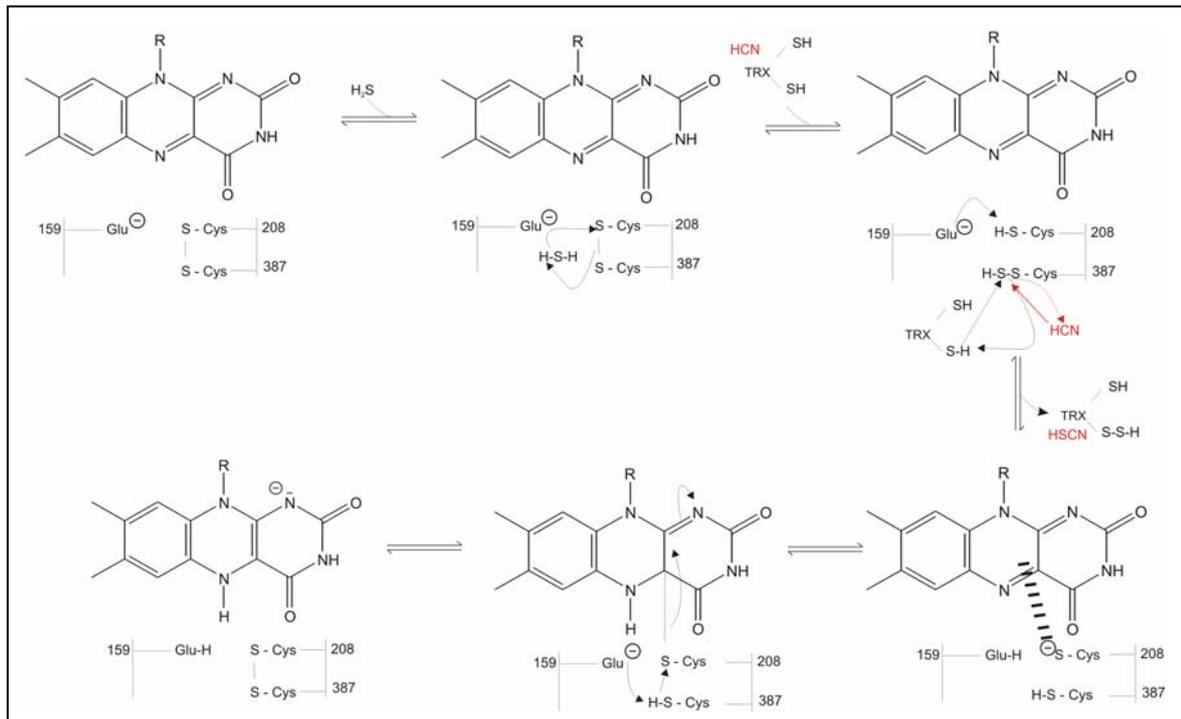


Abb. 4.5: **Möglicher Mechanismus der reduktiven Halbreaktion der mitochondrialen SQR aus *Arenicola marina*.** Durch Sulfid wird die Disulfidbrücke zwischen Cys 208 und 387 gespalten und ein Persulfid entsteht an einem der Cysteine. Durch den Angriff eines Nucleophils (Cyanid, Thioredoxin oder z.B. eine Sulfurtransferase) entsteht eine Thiolgruppe am Cystein und Thiocyanat oder ein Protein-gebundenes Persulfid wird freigesetzt. Die Base Glu 159 entfernt ein Proton von der Thiolgruppe des zweiten Cysteins, wodurch ein Thiolat entsteht. Die negative Ladung kann auf FAD übertragen werden. Dabei entsteht ein kovalentes Addukt zwischen dem Flavin und Cystein. Am Ende der Reaktion liegt Flavin in reduzierter Form vor, und die Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen ist wiederhergestellt (verändert nach Griesbeck *et al.* 2002).

Die in dieser Arbeit beobachtete Substrathemmung der SQR durch Sulfid kann im Zusammenhang mit der reduktiven Halbreaktion diskutiert werden. Sehr hohe Sulfidkonzentrationen führen vielleicht zu unspezifischen Reaktionen von Sulfid mit anderen Cysteinen des Enzyms, wie z.B. Cys 208, das eine andere Funktion bei der Katalyse hat und als Folge tritt eine Hemmung der Reaktion auf. Bei der Thioredoxin-abhängigen Aktivitätsmessung tritt diese Substrathemmung bereits bei vielen geringeren Konzentrationen auf ($K_i = 3,8 \mu\text{M}$ im Vergleich zu $476,5 \mu\text{M}$ in der Cyanid-abhängigen Reaktion). Hier besteht die Möglichkeit, dass Sulfid auch direkt mit Thioredoxin reagiert, und letzteres dann für die Interaktion mit der SQR nicht mehr zur Verfügung steht.

4.3.2 Die oxidative Halbreaktion

Bei der oxidativen Halbreaktion der SQR wird das reduzierte Enzym Chinon-abhängig reoxidiert (Griesbeck *et al.* 2002). In Anlehnung an Rich und Fisher (1999) schlugen Griesbeck *et al.* (2002) einen Mechanismus für die bakterielle SQR vor, bei dem zwei Histidine die zentrale Rolle spielen. Bei der Mutation von Histidin 131 zu Alanin zeigte die *Rhodobacter*-SQR nur noch 20 % der Wildtypaktivität. Auffällig war eine Verschiebung des pH-Optimums von 6,7 zu 4,5. Hieraus schlossen die Autoren, dass dieses Histidin eine Rolle bei der Säurekatalyse spielt. Bei saurem pH kann diese Katalyse auch von Protonen aus der Umgebung übernommen werden. Das zweite konservierte Histidin 196 scheint keine so tragende Rolle zu spielen, da sich die Aktivität nur auf 38 % verringerte und sich das pH-Optimum nur um 0,5 Einheiten verschob, dennoch vermuteten Griesbeck *et al.* (2002) auch für dieses Histidin eine Funktion bei der Säure-Basen-Katalyse.

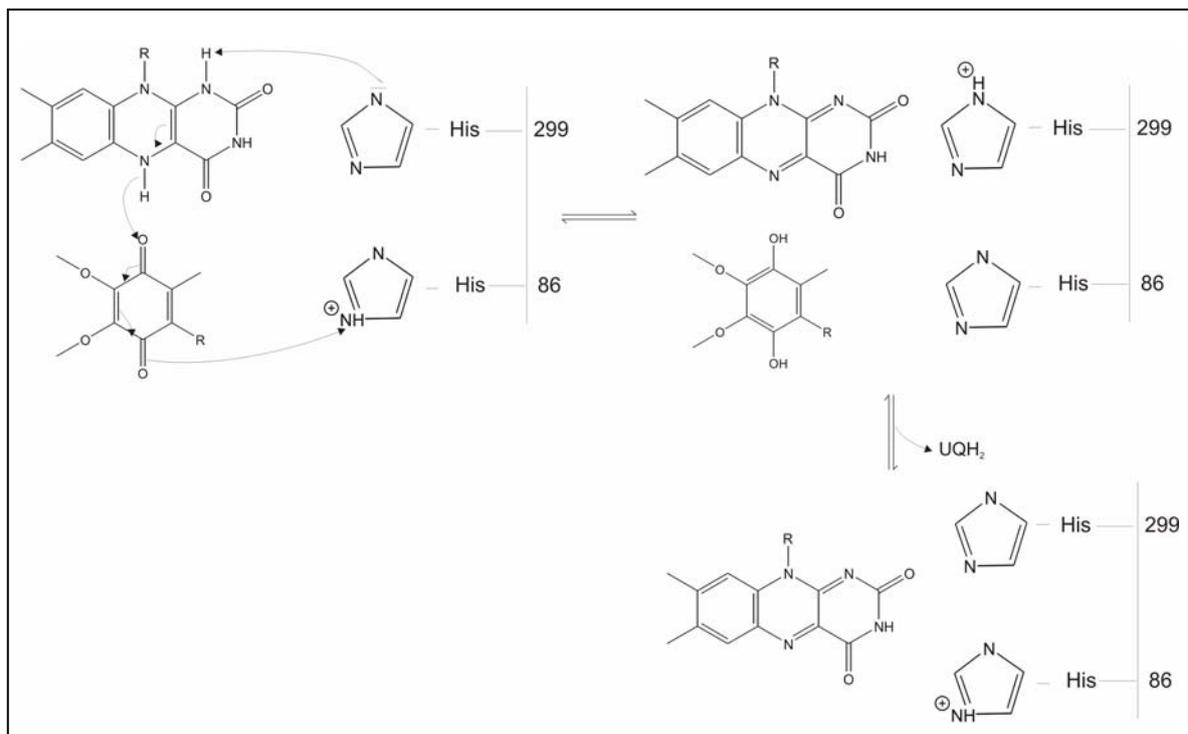


Abb. 4.6: **Möglicher Mechanismus der oxidativen Halbreaktion der mitochondrialen SQR aus *Arenicola marina*.** Ein Hydridion wird vom Flavin auf Ubichinon übertragen, gleichzeitig wird ein Proton vom Flavin auf das deprotonierte His 299 übertragen und die zweite Carbonylgruppe des Ubichinons wird durch His 86 protoniert. Aus der Reaktion gehen reduziertes Ubichinol und oxidiertes Flavin hervor. Durch Reprotonierung der Histidine wird der Ursprungszustand des Enzyms wiederhergestellt (verändert nach Griesbeck *et al.* 2002).

Das pH-Optimum der Wattwurm-SQR liegt bei etwa 9 (siehe Abb. 3.14). Der mitochondriale Matrixraum ist ebenfalls basisch, so dass eine Säurekatalyse durch Protonen aus der Umgebung bei der mitochondrialen SQR unwahrscheinlich ist. Der Verlust der Aktivi-

tät der Wattwurm-SQR nach Austausch der beiden konservierten Histidine 86 und 299 gegen Alanin legt eine Beteiligung dieser Aminosäurereste an der Katalyse wie für die bakterielle SQR beschrieben nahe. Abb. 4.6 zeigt den möglichen Mechanismus der Wattwurm-SQR mit Beteiligung von His 86 und 299.

Die Rolle des Aspartats kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht genau vorhergesagt werden. Unter 4.1.1 wurde eine Beteiligung an der Bindung der Riboseeinheit des FAD bereits diskutiert, definitiv belegt werden kann dies allerdings nur durch eine Strukturaufklärung. Interessant wäre im Vergleich eine Kristallstruktur eines Vertreters aus Gruppe I, der an dieser Position ein Valin besitzt.

4.4 Die physiologische Bedeutung der mitochondrialen SQR

4.4.1 Thiosulfat als Endprodukt der Sulfidentgiftung?

Bei der bakteriellen SQR wurde als Endprodukt Polysulfid nachgewiesen, das entsteht, wenn Sulfid die Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen spaltet und ein enzymgebundenes Persulfid, also Sulfanschwefel, gebildet wird. Der Sulfanschwefel wird wiederum auf ein weiteres Sulfidmolekül übertragen und H_2S_2 entsteht. Die Kette kann noch weiter verlängert werden, so dass am Ende der Reaktion Polysulfide mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von zehn Schwefelatomen vorliegen. In intakten Zellen wird hieraus elementarer Schwefel gebildet (Griesbeck *et al.* 2002).

Die Bildung von Elementarschwefel wurde nur für wenige Eukaryoten beschrieben, hierunter Pilze (Pezet und Pont 1977), die Rotalgen *Erythrophyllum* (Izac, Stierle und Sims 1982) und *Ceramium* (Ikawa *et al.* 1973), die Grünalge *Chlorella fusca* (Krauss, Schäfer und Schmidt 1984) und der marine Nematode *Oncholaimus campyloceroides* (Thiermann, Visman und Giere 2000). Von dieser Seite betrachtet ist es nicht weiter verwunderlich, dass das Endprodukt der eukaryotischen SQR kein freies Polysulfid oder Elementarschwefel ist. Vielmehr wurde bislang Thiosulfat als Hauptprodukt der Sulfidentgiftung im Wattwurm beschrieben und postuliert, dass dieses von einem SQR-ähnlichen Enzym gebildet wird (Völkel und Grieshaber 1992; 1994). Wie bereits oben erwähnt (auch 3.6.2), konnte in Gegenwart von Cyanid im SQR-Reaktionsansatz Thiocyanat nachgewiesen werden, nicht jedoch Thiosulfat (Abb. 3.18). Auch Sulfid, ebenfalls ein mögliches Oxidationsprodukt, war nicht nachzuweisen (Abb. 3.19). Der Verbrauch von Sulfid konnte dahingegen eindeutig nachgewiesen werden, wie in Abb. 3.20 zu erkennen ist. Nun sind folgende Fragen zu klären: Was ist das dritte Substrat der Wattwurm-SQR *in vivo*, und wie kommt es zur Thiosulfatbildung?

4.4.2 Thiosulfatbildung in den Mitochondrien des Wattwurms?

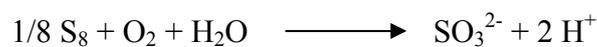
Die Thiosulfatbildung in den Mitochondrien des Wattwurms wurde bereits mehrfach nachgewiesen (z.B. Völkel und Grieshaber 1992; 1994). Völkel und Grieshaber (1996) konnten zudem zeigen, dass der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien mit steigender Sulfidkonzentration zunimmt und zugleich stöchiometrisch Thiosulfat mit einer Rate von bis zu $4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ gebildet wird. Es liegt somit nahe, dass Thiosulfat aus Sulfid gebildet wird. Untermuert wird dies auch durch eine Veröffentlichung von O'Brien und Vetter (1990): Sie konnten zeigen, dass die Mitochondrien der Muschel *Solemya reidi* Sulfid oxidieren und dabei Thiosulfat produzieren. In ihren Experimenten verwendeten sie radioaktiv markiertes Na_2^{35}S und konnten nachweisen, dass beide Schwefelatome im Thiosulfat ebenfalls markiert waren. Sie stellten heraus, dass die beiden Schwefelatome des Thiosulfats in unterschiedlichen Oxidationsstufen vorliegen, der äußere Sulfanschwefel als S^0 und der innere Schwefel als S^{4+} . Als erster Schritt wäre die Bildung von Sulfit als Folge einer sechs-Elektronen Oxidation denkbar gewesen, gefolgt von einer Sulfurtransferase-Reaktion, die Sulfanschwefel auf Sulfit überträgt. Nach Zugabe eines Überschusses von nicht-markiertem Sulfit konnten sie tatsächlich Thiosulfat nachweisen, das nur ein ^{35}S -Atom enthielt. Daraus schlossen sie, dass Thiosulfat in mindestens zwei Schritten aus Sulfid gebildet wird: Zunächst wird Sulfid zu Sulfit oxidiert, dann wird durch Übertragung eines Sulfanschwefels auf Sulfit Thiosulfat gebildet.

Welche Rolle könnte die SQR bei der Bildung von Thiosulfat spielen, das sie bisher *in vitro* nicht selbst direkt bildet? Für die SQR (beschrieben für die Spaltheife in Vande Weghe und Ow 1999 und in dieser Arbeit) und die Rhodanase (Picton *et al.* 2002) wurde bislang nachgewiesen, dass sie Sulfid als Substrat verwerten können. Die Rhodanase ist wie die SQR in den Mitochondrien lokalisiert, ihr K_m für Sulfid liegt jedoch bei 8,8 mM bei einer maximalen Aktivität von $14,6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Der K_m , der für die SQR der Spaltheife ermittelt wurde, liegt zwar ebenfalls im millimolaren Bereich (2 mM, Vande Weghe und Ow 1999), jedoch wurde hier auch ohne Cyanid als Schwefelakzeptor gemessen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die heterolog exprimierte SQR des Wattwurms in Gegenwart von Cyanid einen K_m von 22,9 μM gegenüber Sulfid hat. Die Rhodanaseaktivität wurde ebenfalls in Gegenwart von Cyanid (50 mM) bestimmt, die geringe Substrataffinität macht die Rhodanase aber zu einem weniger geeigneten Kandidaten für eine schnelle Sulfidentgiftung.

4.4.3 Eine Schwefel-Dioxygenase bei Eukaryoten?

Unter der Annahme, dass die SQR das einzige mitochondriale Enzym ist, dessen Substrat Sulfid in mikromolaren Konzentrationen ist, wäre folgender Weg bis zum Thio-sulfat vorstellbar:

Rohwerder und Sand (2003) konnten als Substrat der Schwefel-Dioxygenase (SDO) (EC 1.13.11.18) aus *Acidithiobacillus* spp. und *Acidiphilium* spp. den Sulfanschwe-fel von Persulfiden nachweisen: Die SDO katalysiert die Oxidation von elementarem Schwefel in Gegenwart von Sauerstoff zu Sulfit:



Da Elementarschwefel aus einem stabilen Octasulfanringsystem besteht, das orthorhombi-sche Kristalle mit sehr geringer Wasserlöslichkeit bildet (Steudel 2000), wurde schon frü-her postuliert, dass der Schwefel vor der Oxidation aktiviert werden muss. Glutathion rea-giert mit Elementarschwefel zu Glutathion-Persulfid, das von der SDO als Substrat ange-nommen wird (Rohwerder und Sand 2003). Bei Bakterien wird das gebildete Sulfit durch eine Sulfit:Akzeptor (vermutlich Cytochrom; Vestal und Lundgren 1971) Oxidoreduktase zu Sulfat oxidiert. Rohwerder und Sand (2003) diskutierten auch eine Beteiligung der SQR als Persulfiddonor für die SDO.

Eine SDO oder ein SDO-ähnliches Enzym, das den an der SQR gebundenen Sul-fanschwefel als Substrat verwendet und unter Sauerstoffverbrauch Sulfit bildet, wäre auch in den Wattwurmmitochondrien denkbar (dargestellt in Abb. 4.3). Tatsächlich konnte in den Mitochondrien des Wattwurms (und auch in Rattenmitochondrien) SDO-Aktivität in Gegenwart von Glutathion und Schwefel gemessen werden (Tatjana Przywara, Institut für Zoophysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, persönliche Mitteilung). Hierbei wird Sulfit gebildet. Ebenfalls konnte ein zweites Enzym isoliert werden, dass aus Sulfit und einem Persulfid Thiosulfat bildet (Tatjana Przywara, persönliche Mitteilung). Versu-che, die beiden gereinigten Enzyme zusammen mit gereinigter SQR/His *in vitro* zu kombi-nieren, blieben bislang erfolglos. Nach Sulfidzugabe konnte weder eine decyl-Ubichinon-Reduktion (SQR-Aktivität), noch ein Sauerstoffverbrauch (SDO-Aktivität) gemessen wer-den. Vielleicht liegen die Enzyme *in vivo* als Komplex oder an der Membran assoziiert vor, und die Interaktion kann in Lösung nicht stattfinden. Auf diesem Gebiet müssen noch wei-tere Experimente durchgeführt werden. Leider ist bislang noch keine Gen- oder Proteinse-

quenz einer SDO in Datenbanken veröffentlicht, um nach Homologen in eukaryotischen Genomen zu suchen.

4.4.4 Geringe Sauerstoff- und hohe Sulfidkonzentrationen – ein Problem?

Solange genug Sauerstoff zur Verfügung steht, ist die Entgiftung von Sulfid kein Problem. Ein Weg mit Beteiligung eines SDO-ähnlichen Enzyms und einer Sulfurtransferase, die Sulfanschwefel auf Sulfit überträgt und somit Thiosulfat entsteht, wäre denkbar. Doch der Wattwurm ist in seinem Lebensraum regelmäßig bei Ebbe hohen Sulfidkonzentrationen und gleichzeitig geringen Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt. Völkel und Grieshaber (1994) konnten zeigen, dass die Sulfidoxidation im Wattwurm sauerstoffabhängig ist. Unter normoxischen Bedingungen konnten sie bei Inkubation mit bis zu 330 μM Sulfid keine signifikante Zunahme von Succinat, dem typischen Endprodukt der Anaerobiose (Schroff und Schöttler 1977; Grieshaber *et al.* 1994; Tielens *et al.* 2002), in der Coelomflüssigkeit beobachten. Sulfid wurde stöchiometrisch zu Thiosulfat umgesetzt und erst bei höheren Sulfidkonzentrationen bis zu 1 mM war Succinat nachweisbar. Wohlgemuth, Taylor und Grieshaber (2000) untersuchten ebenfalls die Bildung von Succinat und Thiosulfat im Wattwurm bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen. Unter normoxischen Bedingungen konnten sie kein Succinat in Kontrolltieren und Tieren, die mit 27 μM bzw. 117 μM Sulfid inkubiert wurden, nachweisen. Unter anoxischen Bedingungen jedoch stieg der Succinatgehalt in den Kontrollen ohne Sulfid auf etwa 1,5 $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht, bei den mit 27 μM Sulfid inkubierten Tieren waren etwa 2,6 $\mu\text{mol Succinat/g}$ Frischgewicht nachweisbar, nach Inkubation mit 117 μM Sulfid waren es sogar über 4 $\mu\text{mol Succinat/g}$ Frischgewicht. Die Thiosulfatkonzentration in der Coelomflüssigkeit nahm mit steigender Sulfidkonzentration auf bis zu 5 mM bei einer Sulfidkonzentration von 200 μM und normoxischen Bedingungen zu, bei höheren Sulfidkonzentrationen nahm sie wieder ab. Unter anoxischen Bedingungen konnten Wohlgemuth, Taylor und Grieshaber (2000) weder nach Inkubation mit 27 μM noch mit 117 μM Sulfid Thiosulfat in der Coelomflüssigkeit oder dem Hautmuskelschlauch nachweisen. Erst mit steigender Sauerstoffkonzentration nahm auch die Thiosulfatkonzentration zu.

Marine Invertebraten wie der Wattwurm sind generell zur anaeroben Energiegewinnung fähig (zusammengefasst in Grieshaber *et al.* 1994). Die Fumarat-Reduktase z.B. benutzt Fumarat als finalen Elektronenakzeptor, und es entsteht Succinat. Die Elektronen erhält die Fumarat-Reduktase nicht von Ubichinon, sondern von Rhodochinon, dessen geringeres Redoxpotential diese Reaktion ermöglicht (Van Hellemond und Tielens 1994;

nella-Mutanten ohne Fumarat-Reduktase nicht mehr mit Sulfid und Fumarat wachsen konnten. Daraus schlossen sie, dass die Sulfidoxidation durch Fumarat eine Sulfid-Dehydrogenase, Menachinon und die Fumarat-Reduktase erfordert. Bakterien sind – wie bereits erwähnt – in der Lage, freie Persulfide bzw. Elementarschwefel aus Sulfid zu bilden. Diese Fähigkeit wurde bislang jedoch nur für wenige Eukaryoten nachgewiesen. Vielmehr wäre vorstellbar, dass der Sulfanschwefel von der SQR auf andere Proteine, wie z.B. Sulfurtransferasen übertragen und dort „gespeichert“ wird. Er kann z.B. für den Einbau in Eisen-Schwefel-Zentren oder zur Synthese von Molybdänproteinen verwendet werden, oder – sobald wieder Sauerstoff verfügbar ist – weiter zu Thiosulfat oxidiert werden. *Wolinella* z.B. kann Sulfanschwefel mit Hilfe des Sud-Proteins (E.C. 1.97.1.3) speichern und verfügbar machen. Sud ist als Dimer aktiv und kann je Untereinheit bis zu zehn Schwefelatome aus Polysulfiden binden (Klimmek *et al.* 1998; 1999).

Sulfanschwefel konnte auch bei Eukaryoten als Sulfid-Entgiftungsprodukt unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen werden. Ip *et al.* (1997) konnten bei dem Spritzwurm *Phascolosoma arcuatum* eine dreifache Zunahme von Sulfanschwefel gegenüber aeroben bzw. nicht-sulfidischen Kontrollen nachweisen, wenn die Tiere anaerob mit Sulfid inkubiert wurden. Sie stellten fest, dass die Tiere Thiosulfat aus dem Medium aufnehmen, und bei einer anaeroben Inkubation mit Sulfid und Thiosulfat konnte mehr Sulfanschwefel nachgewiesen werden, als mit Sulfid allein. Sie untersuchten auch die spezifische Aktivität der Rhodanase im Hautmuskelschlauch der Würmer und stellten dabei eine signifikante Aktivitätszunahme bei Sulfid- und/oder Thiosulfat-inkubierten Tieren fest. Später führten Ip, Kuah und Chew (2004) ähnliche Experimente mit dem Schlammpringer *Boleophthalmus boddaerti* durch. Auch sie konnten eine Zunahme von Sulfanschwefel in der Muskulatur und der Leber nach hypoxischer Sulfidinkubation nachweisen. Die spezifische Aktivität der Rhodanase wurde ebenfalls gesteigert. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass unter anaeroben Bedingungen der Schwefel in Form von Sulfanschwefel gelagert wird (Abb. 4.3). Weitere Experimente hierzu sind jedoch notwendig, um den Mechanismus und die beteiligten Enzyme genauer zu untersuchen.

4.4.4 SQR und Sulfid in höheren Eukaryoten

Wie bereits erwähnt, wurde bereits 1972 über Rattenmitochondrien berichtet, die in der Lage sind, Sulfid zu oxidieren (Curtis *et al.*). Später wurde dies auch für Fisch- und Hühnermitochondrien gezeigt (Bagarinao und Vetter 1990; Yong und Searcy 2001). Gagneur (2006) konnte darüber hinaus eine Sulfid- und Cyanid-abhängige decyl-

Ubichinon-Reduktion (wie unter 2.11.6.1 beschrieben) in Ratten- und Bienenmitochondrien messen. Im Lebensraum dieser Tiere liegen in der Regel keine nennenswerten Sulfidkonzentrationen vor, dennoch scheinen die für die Sulfidoxidation notwendigen Enzyme, einschließlich der SQR, exprimiert zu werden.

Nun ist Sulfid nicht nur in bestimmten Lebensräumen anzutreffen, sondern es wird auch endogen sowohl in marinen Invertebraten wie *Arenicola marina* und der Muschel *Tapes philippinarum* (Julian *et al.* 2002) als auch in Säugern (Goodwin *et al.* 1989; Warenycia *et al.* 1989; Savage und Gould 1990) gebildet. Ausgehend von L-Cystein, kann Sulfid auf mindestens 4 verschiedenen Wegen synthetisiert werden (zusammengefasst in Kamoun 2004). In den Mitochondrien sind hauptsächlich die Enzyme Cystein-Aminotransferase (E.C. 2.6.1.3) und 3-Mercapto-Sulfurtransferase (E.C. 2.8.1.2) für die Bildung von Sulfid verantwortlich (zusammengefasst in Kamoun 2004). Das erste Enzym katalysiert zunächst die Reaktion von L-Cystein mit einer Ketosäure (z.B. α -Ketoglutarat), wobei 3-Mercaptopyruvat und eine Aminosäure (z.B. L-Glutamat) entstehen. 3-Mercaptopyruvat kann durch die 3-Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase desulfuriert werden, wobei Sulfid und Pyruvat entstehen (Julian *et al.* 2002). Darüber hinaus produzieren auch die anaeroben sulfatreduzierenden Bakterien, z.B. im menschlichen Darm Sulfid in Konzentrationen, die bereits Komplex IV hemmen (MacFarlane, Gibson und Cummings 1992).

1996 wiesen Abe und Kimura erstmals auf eine Rolle von Sulfid als intrazellulärer Botenstoff in Säugern hin, und seit 2001 (Baranano, Ferris und Snyder) wird die Funktion von Sulfid als atypischer Neuromodulator, zusammen mit den Gasen NO und CO, vielfach diskutiert und untersucht. Eine Überproduktion von Sulfid, hervorgerufen durch eine gesteigerte Aktivität der sulfidproduzierenden Enzyme, kann zu schwerwiegenden Schäden im Gehirn führen. So ist zum Beispiel die cytosolische Cystathion- β -Synthase (CBS; E.C. 4.2.1.22) hauptsächlich für die nicht-mitochondriale Sulfidproduktion verantwortlich (zusammengefasst in Kamoun 2004). Bei Patienten mit Down-Syndrom wurde eine 150 %ige Steigerung der CBS-Aktivität nachgewiesen (Chadefaux *et al.* 1985). Die hohen Sulfidkonzentrationen werden für die mit dem Alter zunehmende geistige Retardierung der Patienten verantwortlich gemacht (Kamoun 2001). Diese Patienten scheiden auch 2,3mal soviel Thiosulfat aus wie gesunde Kontrollpersonen (Belardinelli *et al.* 2001). Auch in Säugern wird das endogen gebildete Sulfid zunächst mit Sauerstoff zu Thiosulfat oxidiert (Huang, Khan und O'Brien 1998). Eine nicht näher charakterisierte „Sulfid-Oxidase“ soll diese Reaktion katalysieren. Es wäre vorstellbar, dass in diesem Reaktionsweg die SQR eines der beteiligten Enzyme ist.

Auch das im menschlichen Darm durch Bakterien gebildete Sulfid muss entgiftet werden, denn es steht in Verdacht, chronische Darmerkrankungen zu verursachen (Pitcher, Beatty und Cummings 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Rhodanase Sulfid entgiften kann und ihre Expression bei Patienten mit Darmentzündungen und Darmkrebs verringert ist (Picton *et al.* 2002; Ramasamy *et al.* 2006). Da die Affinität der Rhodanase gegenüber Sulfid mit einem K_m von 8,8 mM gering ist (Picton *et al.* 2002), wäre es u.U. gewinnbringender zu untersuchen, ob die SQR ebenfalls eine Rolle spielt.

4.5 Die Evolution der SQR oder „Hatte der Vorfahr der Mitochondrien eine SQR?“

Anaerobe Mitochondrien sind besonders interessant, wenn die Frage beantwortet werden soll: wie sah eigentlich der Vorfahr unserer Mitochondrien aus?

Der Vorfahr der Mitochondrien wird als ein fakultativ anaerobes, wasserstoffproduzierendes Eubakterium diskutiert (Martin und Müller 1998). Bei dem Eubakterium handelte es sich vermutlich um ein α -Proteobakterium (Martin und Müller 1998; Gray *et al.* 1999). Von ihm stammen Mitochondrien und ihre wasserstoffproduzierenden Verwandten, die Hydrogenosomen (Müller 1993), ab. Ein fakultativ anaerober Stoffwechsel ist auch heute noch bei einigen Mitochondrien zu finden. Zum Beispiel bei dem Flagellaten *Euglena gracilis*, verschiedenen parasitischen Helminthen (*Fasciola hepatica*, *Ascaris suum*) oder auch marinen Invertebraten wie dem Wattwurm (Tielens *et al.* 2002). Unter 4.3 wurde ein mögliches Zusammenspiel der Fumarat-Reduktase und der SQR unter anaeroben Bedingungen diskutiert. Die ersten Eukaryoten sind vor mindestens 1,5 Billionen Jahren entstanden, als die tieferen Gewässer der Erdozeane anoxisch und sulfidisch waren (Javaux, Knoll und Walter 2001). In dieser Zeit war ein Enzym wie die SQR wahrscheinlich überlebenswichtig für diese frühen Eukaryoten.

Die eukaryotische SQR verzweigt nicht spezifisch mit einer α -proteobakteriellen SQR (Abb. 3.24 und 3.25). Obwohl solch eine spezifische Verzweigung als Kriterium für kernkodierte Gene mit mitochondrialem Ursprung postuliert wurde (Kurland und Andersson 2000; Canback, Andersson und Kurland 2002), kann sie nicht einfach als Gegenargument angebracht werden. Die SQR ist ein Protein mit einer Übereinstimmung von nur 23 % in vielen paarweisen Alignments (siehe 3.2). Für Proteine mit so geringer Konservierung wurde der Verlust von phylogenetischen Signalen bereits beschrieben (Martin *et al.* 2002). Die eukaryotischen Sequenzen werden mit Ausnahme von *Dictyostelium* mit einem Bootstrap von 73 % zusammen gruppiert (untere Abb. 3.25). Werden *Dictyostelium* und auch *Chloroflexus* und *Staphylococcus* mit eingeschlossen, so liegt der Bootstrap für diese

Gruppierung sogar bei 83 %. In Abb. 3.24 ist zu erkennen, dass die SQR unter Prokaryoten wahrscheinlich durch lateralen Gentransfer (LGT) verbreitet wurde. In Gruppe III sind Archaeobakterien und Proteobakterien durchmischt und nicht deutlich voneinander getrennt. Lateraler Gentransfer ist unter Prokaryoten verbreitet und wird vielfach im Zusammenhang mit Gen- und Genomevolution diskutiert (Gogarten, Doolittle und Lawrence 2002). So ist vermutlich auch das Auftreten der bakteriellen Sequenzen von *Chloroflexus* und *Staphylococcus* durch lateralen Gentransfer zu erklären.

Auch für andere Proteine, die zur anaeroben Energiegewinnung beitragen, kann ein eubakterieller Ursprung nicht mit absoluter Gewissheit durch phylogenetische Analysen nachgewiesen werden, darunter z.B. die [Fe]-Hydrogenase (Horner, Foster und Embley 2000; Horner *et al.* 2002), die Pyruvat: Ferredoxin Oxidoreduktase (PFO) (Horner, Hirt und Embley 1999; Rotte *et al.* 2001), viele glykolytische Enzyme (Hannaert *et al.* 2000) sowie die NADH-Oxidase (Nixon *et al.* 2002). Dennoch ist es wahrscheinlich, dass sämtliche Enzyme, die an der anaeroben (und auch aeroben) Energiegewinnung beteiligt sind, gemeinsam übertragen wurden. Der Vorfahr der Mitochondrien ähnelte vielleicht heute existierenden fakultativ anaeroben α -Proteobakterien wie *Rhodospirillum rubrum*, das eine SQR und z.B. Rhodochinon besitzt (Okayama *et al.* 1968). Einem Erwerb „als Ganzes“ steht eine eher unwahrscheinliche „Stück-für-Stück“-Ansammlung der verschiedenen Enzyme und Komponenten (z.B. Chinone) gegenüber.

Somit wurde auch die eukaryotische SQR vermutlich nur einmal im Laufe der Evolution übertragen, und zwar von dem Vorfahren der Mitochondrien. Damals war sie essentiell für die ersten Eukaryoten. Auch heute noch sind viele Tiere auf dieses Enzym angewiesen, wie z.B. der Wattwurm, der im sulfidhaltigen Sediment lebt. Aber vielleicht ist sie auch für Lebewesen wichtig, die zwar in ihrem Lebensraum nicht Sulfid ausgesetzt sind, aber endogen Sulfid produzieren.

4.6 Ausblick

Dass sich der Mechanismus der eukaryotischen SQR von dem der bereits charakterisierten bakteriellen SQRs unterscheidet, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Dennoch sind weitere Untersuchungen nötig, um den Mechanismus aufzuklären. Die heterologe Expression und anschließende Reinigung kann optimiert werden, um höhere Proteinausbeuten in größerer Reinheit zu erhalten, die dann z.B. Kristallisationsversuche ermöglichen.

Auch die tatsächlichen Interaktionspartner der SQR *in vivo* sind noch nicht bekannt. Es ist die Frage zu klären, ob Thioredoxin tatsächlich eine Rolle spielt. Da in der vorlie-

genden Arbeit nur Thioredoxin aus *E. coli* verwendet wurde, wäre es interessant, die Aktivität der Wattwurm-SQR mit Wattwurm-Thioredoxin zu überprüfen. Außerdem muss untersucht werden, ob die Enzyme, die einer bakteriellen Schwefel-Dioxygenase ähneln und deren Aktivität im Wattwurm gemessen wurde, mit der SQR interagieren können.

5. Literaturverzeichnis

Abe K, Kimura H (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuro-modulator. *J. Neurosci.* 16: 1066-1071.

Adachi J und Hasegawa M (1996) Computer Science Monographs, No. 28. MOLPHY Version 2.3: Programs for Molecular Phylogenetics Based on Maximum Likelihood. Institute of Statistical Mathematics, Tokyo.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.

Aminlari M, Gilanpour H (1991) Comparative studies on the distribution of rhodanese in different tissues of domestic animals. *Comp. Biochem. Physiol. B* 99: 673-677.

Anbar AD, Knoll AH (2002) Proterozoic ocean chemistry and evolution: a bioinorganic bridge. *Science* 297: 1137-1142.

Anderson AE, Childress JJ, Favuzzi JA (1987) Net uptake of CO₂ driven by sulphide and thiosulfate oxidation in the bacterial symbiont-containing clam *Solemya reidi*. *J. Exp. Biol.* 133: 1-31.

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

Arp AJ, Childress JJ, Vetter RD (1987) The sulfide-binding protein in the blood of the vestimentiferan tube worm, *Riftia pachyptilia*, is the extracellular hemoglobin. *J. Exp. Biol.* 128: 139-158.

Atteia A, van Lis R, van Hellemond JJ, Tielens AGM, Martin W, Henze K (2004) Identification of prokaryotic homologues indicates an endosymbiotic origin for the alternative oxidases of mitochondria (AOX) and chloroplasts (PTOX). *Gene* 330: 143-148.

Bagani S, Bonomi F, Cerletti P (1984) Enzymic synthesis of the iron-sulfur cluster of spinach ferredoxin. *Eur. J. Biochem.* 275: 361-366.

Bagarinao T, Vetter RD (1990) Oxidative detoxification of sulfide by mitochondria of the California killifish *Fundulus parvipinnis* and the speckled sanddab *Citharichthys stigmmaeus*. *J. Comp. Physiol.* 160B: 519-527.

Bailly X, Jollivet D, Vanin S, Deutsch J, Zal F, Lallier F, Toulmond A (2002) Evolution of the Sulfide-binding function within the globin multigenic family of the deep-sea hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Mol. Biol. Evol.* 19: 1421-1433.

Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K, Miyano S. (2001) Views: Fundamental building blocks in the process of knowledge discovery, In: Proceedings of the 14th International FLAIRS Conference. AAAI Press. S. 233-238.

- Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K, Miyano S. (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* 18: 298-305.
- Baranano DE, Ferris CD, Snyder SH (2001) Atypical neural messengers. *Trends Neurosci.* 24: 99-106.
- Bartholomew TC, Powell GM, Dodgson KS, Curtis CG (1980) Oxidation of Sodium Sulfide by Rat-Liver, Lungs and Kidney. *Biochem Pharmacol* 29: 2431-2437.
- Beauchamp ROJ, Bus JS, Popp JA, Boreiko CR, Andjelkovich DA (1983) A critical review of the literature on hydrogen sulfide. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 13: 25-97.
- Beerman H (1924) Some physiological actions of hydrogen sulfide. *J. Exp. Zool.* 41: 33-43.
- Belardinelli MC, Chabli A, Chadefaux-Vekemans B, Kamoun P (2001) Urinary sulfur compounds in Down syndrome. *Clin. Chem.* 47: 1500-1501.
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Bradford MM (1976) A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bronstein M, Schütz M, Hauska G, Padan E, Shahak Y (2000) Cyanobacterial sulfide-quinone reductase: cloning and heterologous expression. *J. Bacteriol.* 182: 3336-3344.
- Brune DC (1995) Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. In: *Anoxygenic photosynthetic bacteria* (R. E. Blankenship, M. T. Madigan und C. E. Bauer, Hrsg.), Dordrecht, Netherlands: 847-870.
- Bryant D, Moulton V (2004) Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of planar phylogenetic networks. *Mol. Biol. Evol.* 21: 255-265.
- Canback B, Andersson SG, Kurland CG (2002) The global phylogeny of glycolytic enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6097-6102.
- Canfield DE (1998) A new model for Proterozoic ocean chemistry. *Nature* 396: 450-453.
- Cardozo RH, Edelmann IS (1952) The volume of distribution of sodium thiosulfate as a measure of the extracellular fluid space. *J. Clin. Invest.* 31: 280-290.
- Chadefaux B, Rethore MO, Raoul O, Ceballos I, Gilgenkrantz S, Allard D (1985) Cystathionine beta synthase gene dosage effect in trisomy 21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 40-44.
- Chen Z, Koh M, Van Driessche G, Van Beeumen JJ, Bartsch RG, Meyer TE, Cusanovich MA, Mathews FS (1994) The structure of flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from a purple phototrophic bacterium. *Science* 266: 430-432.

Childress JJ, Fisher CR, Favuzzi JA, Kochevar RE, Sanders NK, Alayse AM (1991) Sulfide-driven autotrophic balance in the bacterial symbiont-containing hydrothermal vent tubeworm, *Riftia pachyptila* Jones. Biol. Bull. 180: 135-153.

Claros MG, Vincens P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. Eur. J. Biochem. 241: 779-786.

Curtis CG, Bartholomew TC, Rose FA, Dodgson KS (1972) Detoxication of Sodium S-35-Sulfide in Rat. Biochem Pharmacol 21: 2313-2321.

Cusanovich MA, Meyer TE, Bartsch RG (1991) Flavocytochrome c. In: Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes (Müller F., Hrsg.), CRC press, Boca Raton, FL, Vol. II: 377-393.

Devereux J, Haeberli P, Smithies O (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic Acids Res. 2: 387-395.

Doeller JE, Grieshaber MK, Kraus DW (2001) Chemolithoheterotrophy in a metazoan tissue: thiosulfate production matches ATP demand in ciliated mussel gills. J. Exp. Biol. 204: 3755-3764.

Dubilier N, Giere O, Grieshaber MK (1995) Morphological and ecophysiological adaptations of the marine oligochaete *Tubificoides benedii* to sulfidic sediments. Amer. Zool. 35: 163-173.

Eggink G, Engel H, Vriend G, Terpstra P, Witholt B (1990) Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*: Structural Relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD or two FAD fingerprints. J. Mol. Biol. 212: 135-142.

Evans CL (1967) The toxicity of hydrogen sulfide and other sulfides. Quart. J. Physiol. 52: 231-249.

Felsenstein J (1980) PHYLIP manual, version 3.3. - Berkeley: University Herbarium.

Fenchel TM, Riedl (1970) The sulfide system: a new biotic community underneath the oxidized layer of marine sand bottoms. Mar. Biol. 7: 255-268.

Fukumori Y, Yamanaka T (1979) Flavocytochrome c of *Chromatium vinosum*. Some enzymatic properties and subunit structure. J. Biochem. 85: 1405-1414.

Gagneur M (2006) Charakterisierung des Enzyms Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase in verschiedenen Tierarten. Diplomarbeit an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Gershoni JM, Palade GE (1983) Protein blotting: principles and application. Anal. Biochem. 131: 1-15.

Gogarten JP, Doolittle WF, Lawrence JG (2002) Prokaryotic evolution in light of gene transfer. Mol. Biol. Evol. 19 (12): 2226-2238.

Goodwin LR, Francom D, Dieken FP, Taylor JD, Warenycia NW, Reiffenstein RJ, Dowling G (1989) Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: post-mortem studies and two case reports. *J. Anal. Toxicol.* 13: 105-109.

Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476-1481.

Griesbeck C, Hauska G, Schütz M (2000) Biological Sulfide-Oxidation: Sulfide-Quinone Reductase (SQR), the primary reaction. In: *Recent Research Developments in Microbiology* (Pandalai, SG, Hrsg.) 4: 179-203

Griesbeck C, Schütz M, Schödl T, Bathe S, Nausch L, Mederer N, Vielreicher M, Hauska G (2002) Mechanism of Sulfide-Quinone Reductase investigated using site-directed mutagenesis and sulfur analysis. *Biochemistry* 41: 11552-11565.

Grieshaber MK, Hardewig I, Kreutzer U, Pötner HO (1994) Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 125: 44-147.

Grieshaber MK, Völkel S (1998) Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Ann. Rev. Physiol.* 60: 30-53.

Hannaert V, Brinkmann H, Nowitzki U, Lee JA, Albert MA, Sensen CW, Gaasterland T, Müller M, Michels P, Martin W (2000) Enolase from *Trypanosoma brucei*, from the amitochondriate protist *Mastigamoeba balamuthi*, and from the chloroplast and cytosol of *Euglena gracilis*: pieces in the evolutionary puzzle of the eukaryotic glycolytic pathway. *Mol. Biol. Evol.* 17: 989-1000.

Hergert U (1998) Sulfobiose bei der Miesmuschel, *Mytilus edulis*. Staatsexamensarbeit an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Heukeshoven J, Dernick R (1988) Increased sensitivity for Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem Development Unit. *Electrophoresis* 9: 60-61.

Horner DS, Foster PD, Embley TM (2000) Iron hydrogenase and the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1695-1709.

Horner DS, Heil B, Happe T, Embley TM (2002) Iron hydrogenases – ancient enzymes in modern eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 27: 148-153.

Horner DS, Hirt RP, Embley TM (1999) A single eubacterial origin of eukaryotic pyruvate: ferredoxin oxidoreductase: implications for the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1280-1291.

Huang J, Khan S, O'Brien PJ (1998) The glutathione dependence of inorganic sulfate formation from L- or D-cysteine in isolated rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 110: 189-202.

Huson DH (1998) SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* 14: 68-73.

Iciek M, Wlodek L (2001) Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur. *Pol. J. Pharmacol.* 53: 215-225.

Ikawa M, Thomas VM Jr, Buckley LJ, Uebel JJ (1973) Sulfur and the toxicity of the red algae *Ceramium rubrum* to *Bacillus subtilis*. *J. Phycol.* 9: 302-304.

Ip YK, Kuah SSL, Chew SF (2004) Strategies adopted by the mudskipper *Boleophthalmus boddarti* to survive sulfide exposure in normoxia or hypoxia. *Physiol. Biochem. Zool.* 77 (5): 824-837.

Ip YK, Tan GQ, Kuah SSL, Chew SF (1997) Detoxification of environmental sulfide to sulfane sulfur in the intertidal sipunculid *Phascolosoma arcuatum*. *J. Comp. Physiol. B* 167: 213-220.

Izac RR, Stierle DB, Sims JJ (1982) Sulfur and N-methylformamide from the marine red algae *Erythrophyllum delesserioides*. *Phytochemistry* 21: 229.

Javaux EJ, Knoll AH, Walter MR (2001) Morphological and ecological complexity in early eukaryotic ecosystems. *Nature* 412: 66-69.

Jones MG, Bickar D, Wilson MT, Brunori M, Colosimo A, Sarti P (1984) A re-examination of the reactions of cyanide with cytochrome c oxidase. *Biochem. J.* 220: 57-66.

Jones EW (1991) Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 194: 428-53.

Julian D, Statile JL, Wohlgemuth SE, Arp AJ (2002) Enzymatic hydrogen sulfide production in marine invertebrate tissues. *Comp. Biochem. Physiol. A* 133: 105-115.

Kamoun P (2001) Mental retardation in Down syndrome: a hydrogen sulfide hypothesis. *Med. Hypoth.* 57: 389-392.

Kamoun P (2004) Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids* 26: 243-254.

Karplus PA, Schulz GE (1987) Refined structure of Glutathione reductase at 1.54 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 195: 701-729.

Kelly DP, Shergill JK, Lu WP, Wood AP (1997) Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71: 95-107.

Klein M (1998) Charakterisierung der Sulfidoxidase-Aktivität bei sulfidtoleranten Tieren. Diplomarbeit an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Klimmek O, Kreis V, Klein C, Simon J, Wittershagen A, Kröger A (1998) The function of the periplasmic Sud protein in polysulfide respiration of *Wolinella succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* 253: 263-269.

- Klimmek O, Stein T, Pisa R, Simon J, Kröger A (1999) The single cysteine residue of the Sud protein is required for its function as a polysulfide-sulfur transferase in *Wolinella succinogenes*. Eur. J. Biochem. 263: 79-84.
- Krauss F, Schäfer W, Schmidt A (1984) Formation of elemental sulfur by *Chlorella fusca* during growth on L-cysteine ethylester. Plant Physiol. 74: 176-182.
- Krüger F (1971) Bau und Lebensweise des Wattwurms *Arenicola marina*. Helgoländer wiss. Meeresunters. 22: 149-200.
- Kurland CG, Andersson SG (2000) Origin and evolution of the mitochondrial proteome. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 786-820.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF, McCoy JM (1993) A thio-redoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. Bio/Technol. 11: 187-193.
- Lee RW, Kraus D, Doeller JE (1996) Sulfide-stimulation of oxygen consumption rate and cytochrome reduction in gills of the estuarine mussel *Geukensia demissa*. Biol. Bull. 191: 421-430.
- Leiers B (1998) Die Sulfid-Chinon-Reduktase von *Arenicola marina* L.. Diplomarbeit an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- MacFarlane GT, Gibson GR, Cummings JH (1992) Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. J. Appl. Bacteriol. 72: 57-64.
- Macy JM, Schröder I, Thauer RK, Kröger A (1986) Growth of *Wolinella succinogenes* on H₂S plus fumarate and on formate plus sulfur as energy sources. Arch. Microbiol. 144: 147-150.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2001) Brock Mikrobiologie. Spektrum Lehrbuch, Spektrum Akademischer Verlag.
- Martin W, Müller M (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. Nature 392: 37-41.
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 12246-12251.
- Matthies A, Nimtz M, Leimkühler S (2005) Molybdenum cofactor biosynthesis in humans: identification of a persulfide group in the rhodanese-like domain of MOCS3 by mass spectrometry. Biochemistry 44: 7912-7920.
- McDonald AE, Vanleberghe GC (2004) Branched mitochondrial electron transport in the animalia: presence of alternative oxidase in several animal phyla. IUBM Life 56: 333-341.

Millero FJ, Hubinger S, Fernandez M, Garnett S (1987) Oxidation of H₂S in seawater a function of temperature, pH, and ionic strength. *Environ. Sci. Technol.*: 21: 439-443.

Mintel R, Westley J (1966) The rhodanese reaction. *J. Biol. Chem.* 241: 3381-3385.

Miroux B, Walker JE (1996) Over-production in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* 260: 289-298.

Morton RA (1965) Spectroscopy of quinones and related substances. In: *Biochemistry of quinones* (Morton RA, Hrsg.) Academic Press, London: 23-64.

Müller M (1993) The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* 139: 2879-2889.

Nagahara N, Ito T, Minami M (1999) Mercaptopyruvate sulfurtransferase as a defense against cyanide toxication: molecular properties and mode of detoxification. *Histol. Histo-pathol.* 14: 1277-1286.

Nandi DL, Westley J (1998) Reduced thioredoxin as a sulfur-acceptor substrate for rhodanese. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30: 973-977.

Nandi DL, Horowitz PM, Westley J (2000) Rhodanese as a thioredoxin reductase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32: 465-473.

National Research Council (1979) Subcommittee on Medical and Biological Effects on Environmental Pollutants, Division of Medical Sciences, Assembly of Live Sciences. *Hydrogen Sulfide*. Baltimore, University Park Press.

Newton GL, Dorian R, Fahey RC (1981) Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 114: 383-387.

Nicholls P (1975) The effect of sulfide on cytochrome aa₃. Isosteric and allosteric shifts of the reduced α -Peak. *Biochim. Biophys. Acta* 396: 24-35.

Nixon JEJ, Wang A, Field J, Morrison HG, McArthur AG, Sogin ML, Loftus BJ, Samuelson J (2002) Evidence for lateral transfer of genes encoding ferredoxins, nitroreductases, NADH oxidase, and alcohol dehydrogenase 3 from anaerobic prokaryotes to *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*. *Euk. Cell* 1: 181-190.

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

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

Oeschger R, Schmaljohann R (1988) Association of various types of epibacteria with *Halicryptus spinulosus* (Priapulida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 48: 285-293.

- Oeschger R, Janssen HH (1991) Histological studies on *Halicryptus spinulosus* (Priapulida) with regard to environmental hydrogen sulfide resistance. *Hydrobiologia* 222: 1-12.
- Okayama S, Yamamoto N, Nishikawa K, Horio T (1968) Roles of ubiquinone-10 and rhodoquinone in photosynthetic formation of adenosine triphosphate by chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* 243: 2995-2999.
- Pai EF, Schulz GE (1983) The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from x-ray diffraction analyses of reaction intermediates. *J. Biol. Chem.* 258: 1752-1757.
- Pezet R, Pont V (1977) Elemental sulfur: Accumulation in different species of fungi. *Science* 196: 428-429.
- Picton R, Eggo MC, Merrill GA, Langman MJS, Singh S (2002) Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese. *Gut* 50: 201-205.
- Pitcher MCL, Beatty ER, Cummings JH (2000) The contribution of sulphate reducing bacteria and 5-aminosalicylic acid to faecal sulphide in patients with ulcerative colitis. *Gut* 46: 64-72.
- Ploegman JH, Drent G, Kalk KH, Hol WGJ, Heinrikson RL, Keim P, Weng L, Russell J (1978) The covalent and tertiary structure of bovine liver rhodanese. *Nature* 273: 124-129.
- Poethke W (1973) *Praktikum der Maßanalyse*. Verl. Th. Steinkopf, Dresden.
- Powell MA, Somero GN (1985) Sulfide oxidation occurs in the animal tissue of the gutless clam, *Solemya reidi*. *Biol. Bull.* 169: 164-181.
- Ramasamy S, Singh S, Tanriere P, Langman MJS, Eggo MC (2006) Sulfide-detoxifying enzymes in the human colon are decreased in cancer and upregulated in differentiation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291(2): 288-296.
- Ray WK, Zeng G, Potters MB, Mansuri AM, Larson TJ (2000) Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J. Bacteriol.* 182: 2277-2284.
- Reinartz M, Tschäpe T, Brüser T, Trüper HG, Dahl C (1998) Sulfide oxidation in the phototrophic bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* 170: 59-68.
- Rich P, Fisher N (1999) Quinone-binding sites in membrane proteins: structure, function and applied aspects. *Biochem. Soc. Trans.* 27: 561-565.
- Rohwerder T, Sand W (2003) The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp.. *Microbiology* 149: 1699-1709.
- Rotte C, Stejskal F, Zhu G, Keithly JS, Martin W (2001) Pyruvate:NADP⁺ oxidoreductase from the mitochondrion of *Euglena gracilis* and from the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*: a fusion of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Mol. Biol. Evol.* 18: 710-720.

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger J, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

Savage JC, Gould DH (1990) Determination of sulfides in brain tissue and rumen fluid by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 526: 540-545.

Schierbeek AJ, Swarte MBA, Dijkstra BW, Vriend G, Read RJ, Hol WGJ, Drenth J (1989) X-ray structure of Lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* determined by a combination of molecular and isomorphous replacement techniques. *J. Mol. Biol.* 206: 365-379.

Schneider G, Sjöling S, Wallin E, Wrede P, Glaser E, von Heijne G (1998) Feature-extraction from endopeptidase cleavage sites in mitochondrial targeting peptides. *Proteins* 30: 49-60.

Schreuder HA, van der Laan JM, Hol WGJ, Drenth J (1988) Crystal structure of p-Hydroxybenzoate hydroxylase complexed with its reaction product 3,4-dihydroxybenzoate. *J. Mol. Biol.* 199: 637-648.

Schroff G, Schöttler U (1977) Anaerobic reduction of fumarate in the body wall musculature of *Arenicola marina* (Polychaeta). *J. Comp. Physiol. B* 116: 325-336.

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

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

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

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

Shen Y, Buick R, Canfield DE (2001) Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the early Archean era. *Nature* 410: 77-81.

Shibata H, Kobayashi S (2006) Characterization of a HMT2-like enzyme for sulfide oxidation from *Pseudomonas putida*. *Can. J. Microbiol.* 52: 724-730.

Simon J, Gross R, Ringel M, Schmidt E, Kröger A (1998) Deletion and site-directed mutagenesis of the *Wolinella succinogenes* fumarate reductase operon. *Eur. J. Biochem.* 251: 418-426.

- Sorbo B (1953) Crystalline rhodanese. I. Purification and physicochemical examination. *Acta Chem. Scand.* 7: 1129-1136.
- Sorbo B (1957) Enzymic transfer of sulfur from mercaptopyruvate to sulfite or sulfinates. *Biochim. Biophys. Acta* 24: 324-329.
- Stetter KO (1996) Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 18: 149-158.
- Stedel R (1996) Das gelbe Element und seine erstaunliche Vielfaltigkeit. *Chemie in unserer Zeit* 30 (5): 226-234.
- Stedel R (2000) The chemical sulfur cycle. In: Lens PNL, Hulshof L (Hrsg) *Environmental technologies to treat sulfur pollution*. Pol. London: IWA Publishing: 1-31.
- Theissen U, Hoffmeister M, Grieshaber M, Martin W (2003) Single eubacterial origin of eukaryotic Sulfide:Quinone Oxidoreductase, a mitochondrial enzyme conserved from the early evolution of eukaryotes during anoxic and sulfidic times. *Mol. Biol. Evol.* 20 (9): 1564-1574.
- Thiermann F, Vismann B, Giere O (2000) Sulphide tolerance of the marine nematode *Oncholaimus campylocercoides* – a result of internal sulfur formation? *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 193: 251-159.
- Thollesson M (2004) LDDist: a perl module for calculating LogDet pair-wise distances for protein and nucleotide sequences. *Bioinformatics* 20: 416-418.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Tielens AGM, Rotte C, van Hellemond JJ, Martin W (2002) Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.* 27: 564-572.
- Tielens AGM, Van Hellemond JJ (1998) The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* 1365: 71-78.
- Trüper HG (1984) Microorganisms and the sulfur cycle: In: Müller A, Krebs B (Hrsg) *Sulfur: Its significance for chemistry, for the geo-, bio-, and cosmosphere and technology*. Studies in inorganic chemistry. Elsevier, Amsterdam: 351-365.
- Turchin A, Lawler JF (1998) The Primer Generator: A program that facilitates the selection of oligonucleotides for site- directed mutagenesis. *BioTechniques* 26: 672-676.
- VanBeeumen JJ, Demol H, Samyn B, Bartsch RG, Meyer TE, Dolata MM, Cusanovich MA (1991) Covalent structure of the diheme cytochrome subunit and amino-terminal sequence of the flavoprotein subunit of flavocytochrome c from *Chromatium vinosum*. *J. Biol. Chem.* 266: 12921-12931.
- Van Dover CL (2000) *The ecology of deep-sea hydrothermal vents*. Princeton University Press.

Van Hellemond JJ, Klockiewicz M, Gaasenbeek CPH, Roos MH, Tielens AGM (1995) Rhodoquinone and complex II of the electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 270: 31065-31070.

Van Hellemond JJ, Tielens AGM (1994) Expression and functional properties of fumarate reductase. *Biochem. J.* 304: 321-331.

Vande Weghe JG, Ow DW (1999) A fission yeast gene for mitochondrial sulfide oxidation. *J. Biol. Chem.* 274(19): 13250-13257.

Van Driessche G, Koh M, Chen ZW, Mathews FS, Meyer TE, Bartsch RG, Cusonovich MA, Van Beeumen JJ (1996) Covalent structure of the flavoprotein subunit of the flavocytochrome c: Sulfide dehydrogenase from the purple phototrophic bacterium *Chromatium vinosum*. *Protein Science* 5: 1753-1764.

Vanleberghe GC, McIntosh L (1997) Alternative oxidase: from gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 703-734.

Vestal JR, Lundgren DG (1971) The sulfite oxidase of *Thiobacillus ferrooxidans* (*Ferrobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Biochem.* 49: 1125-1130.

Vetter RD, Matrai PD, Javor B, O'Brien J (1989) Reduced sulfur compounds in the marine environment: analysis by HPLC. In: *Biogenic Sulfur in the Environment* (Saltzman E, Cooper W, Hrsg), American Chemical Society, Symposia Series 393: 243-261.

Völkel S, Grieshaber MK (1992) Mechanisms of sulfide tolerance in the peanut worm *Sipunculus nudus* (Sipunculida) and in the lugworm *Arenicola marina* (Polychaeta). *J. Comp. Physiol. B* 162: 469-477.

Völkel S, Grieshaber MK (1994) Oxygen-dependent sulfide detoxification in the lugworm *Arenicola marina*. *Mar. Biol.* 118: 137-147.

Völkel S, Grieshaber MK (1996) Mitochondrial sulfide oxidation in *Arenicola marina*: Evidence for alternative electron pathways. *Eur. J. Biochem.* 235: 231-237.

Völkel S, Grieshaber MK (1997) Sulphide oxidation and oxidative phosphorylation in the mitochondria of the lugworm *Arenicola marina*. *J. Exp. Biol.* 200: 83-92.

Völkel S, Hauschild K, Grieshaber MK (1995) Sulfide stress and tolerance in the lugworm *Arenicola marina* during low tide. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 122: 205-215.

Von Jagow G, Link TA, Schägger H (1994) Purification strategies for membrane proteins. In: *A practical guide to membrane protein purification*, Academic Press: 3-21.

Wang W, Malcolm BA (1999) Two-Stage PCR Protocol Allowing Introduction of Multiple Mutations, Deletions and Insertions Using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *BioTechniques* 26: 680-682.

Warenycia MW, Goodwin LR, Benishin CG, Reiffenstein RJ, Francom DM, Taylor JD, Dicken FP (1989) Acute hydrogen sulfide poisoning: demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochem. Pharmacol.* 38: 973-981.

- Watling L (1991) The sedimentary milieu and its consequences for resident organisms. *Am. Zool.* 31: 789-796.
- Westley J (1973) Rhodanese. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 39: 327-368.
- Westley J, Adler H, Westley L, Nishida C (1983) The sulfurtransferases. *Fundam. Appl. Toxicol.* 3: 377-382.
- Wohlgemuth SE, Taylor AC, Grieshaber MK (2000) Ventilatory and metabolic responses to hypoxia and sulphide in the lugworm *Arenicola marina* (L.). *J. Exp. Biol.* 203: 3177-3188.
- Wierenga RK, Terpstra P, Hol WGJ (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* 187: 101-107.
- Williams CH Jr. (1992) Lipoamide dehydrogenase, Glutathione reductase, and Mercuric ion reductase: A family of flavoenzyme transhydrogenases. In: *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes* (Müller F, Hrsg.), CRC press, Boca Raton, FL, Vol. III: 121-211.
- Williams CH Jr. (1995) Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *FASEB J.* 9: 1267-1276.
- Wood JL (1987) Sulfane sulfur. *Meth. Enzymol.* 143: 25-29.
- Würfel M, Häberlein I, Follmann H (1993) Facile sulfitolysis of the disulfide bonds in oxidized thioredoxin and glutaredoxin. *Eur. J. Biochem.* 211: 609-614.
- Yong R, Searcy DG (2001) Sulfide oxidation coupled to ATP synthesis in chicken liver mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol. B* 129: 129-137.

6. Anhang

1. Zugangsnummern der verwendeten SQR-Sequenzen

<i>Anopheles gambiae</i>	EAA08424
<i>Aphanothece halophytica</i>	AAF72963
<i>Apis mellifera</i>	XP_397487
<i>Aquifex aeolicus</i>	NP_214500
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	NP_069393
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_746894
<i>Bos taurus</i>	AAI04606
<i>Burkholderia fungorum</i>	ZP_00032335
<i>Canis familiaris</i>	XP_535464
<i>Chlorobium tepidum</i>	NP_661917
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	ZP_00765547
<i>Danio rerio</i>	XP_701822
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	ABB37024
<i>Dictyostelium discoideum</i>	XP_629726
<i>Drosophila melanogaster</i>	NP_647877
<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	ZP_00610125
<i>Gallus gallus</i>	XP_413825
<i>Homo sapiens</i>	AAH16836
<i>Magnetococcus sp.</i>	ZP_00605828
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	ZP_00055086
<i>Mus musculus</i>	BAB25580
<i>Nitrosomonas europaea</i>	NP_842556
<i>Nostoc sp. PCC 7120</i>	NP_488552
<i>Oscillatoria limnetica</i>	AAF72962
<i>Pasteurella multocida</i>	NP_246416
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NP_251035
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	YP_349187
<i>Pseudomonas syringae</i>	YP_233191
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	NP_560139
<i>Ralstonia metallidurans</i>	YP_584519
<i>Ralstonia solanacearum</i>	NP_519663

<i>Rhodobacter capsulatus</i>	CAA66112
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	YP_355064
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	YP_427394
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_596067
<i>Staphylococcus aureus</i>	NP_370612
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	NP_343961
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	NP_378208
<i>Synechocystis sp. PCC</i>	NP_440916
<i>Thermoplasma volcanium</i>	NP_110992
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	NP_681079
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	AAM52227
<i>Xenopus laevis</i>	AAH54152
<i>Xenopus tropicalis</i>	NP_001016956

2. Zugangsnummern anderer Sequenzen

Flavocytochrom c (<i>Allochromatium vinosum</i>)	AAB86576
Glutathion-Reduktase (<i>Homo sapiens</i>)	NP_000628
Thioredoxin-Reduktase (<i>Homo sapiens</i>)	AAB35418
Pyruvat-Dehydrogenase (<i>Homo sapiens</i>)	AAF67480

Zusammenfassung

Der Wattwurm *Arenicola marina* ist in seinem Lebensraum relativ hohen Sulfidkonzentrationen ausgesetzt. Durch Untersuchungen an ganzen Tieren bzw. isolierten Mitochondrien wurde nachgewiesen, dass der Wattwurm Sulfid tolerieren und die Elektronen aus Sulfid sogar zur ATP-Synthese nutzen kann. Es wurde ein der bakteriellen Sulfid:Chinon Oxidoreduktase (SQR) ähnliches Enzym in den Mitochondrien der Tiere vermutet, das die Elektronen von Sulfid auf Ubichinon überträgt.

In der vorliegenden Arbeit konnte das Gen für die SQR aus dem Wattwurm isoliert und erfolgreich in der Mitochondrienmembran der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden. Die Fusion des Proteins mit sechs Histidinen ermöglichte eine einfache Reinigung über eine NiNTA-Matrix.

Im Gegensatz zu den bereits charakterisierten bakteriellen SQRs ist die SQR des Wattwurms nur in Gegenwart von millimolaren Konzentrationen Cyanid aktiv. Wie das Enzym Rhodanase, überträgt sie Sulfanschwefel auf Cyanid, wobei Thiocyanat gebildet wird. Cyanid konnte durch mikromolare Konzentrationen Thioredoxin zusammen mit millimolaren Konzentrationen Sulfit ersetzt werden.

Auch auf Proteinsequenzebene unterscheiden sich die SQRs aus dem Wattwurm und anderen Eukaryoten von den bakteriellen Enzymen. So konnten nur drei der für Letztere identifizierten SQR-Fingerprints in allen Sequenzen nachgewiesen werden, darunter zwei Cysteine und ein konserviertes Glycin in der FAD-Bindedomäne III. Ein drittes Cystein fehlt den eukaryotischen SQRs, und in der FAD-Bindedomäne besitzen sie kein konserviertes Valin (wie die bakteriellen SQRs), sondern ein Aspartat.

Es wurden sechs in eukaryotischen SQRs konservierte Aminosäuren durch gerichtete Mutagenese ausgetauscht. Bei keinem der mutierten Proteine war Aktivität nachweisbar. In Anlehnung an den bereits aufgeklärten Reaktionsmechanismus der bakteriellen SQR wurde ein Mechanismus für die mitochondriale SQR vorgeschlagen.

Als Endprodukt der Sulfidentgiftung wurde bislang in Wattwürmern und ihren Mitochondrien Thiosulfat nachgewiesen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Thiosulfat nicht direkt von der SQR gebildet wird. Diese bildet wahrscheinlich nur ein enzymgebundenes Persulfid, das z.B. von Thioredoxin oder möglicherweise einer Sulfurtransferase abgelöst und in Gegenwart von Sauerstoff weiter zu Thiosulfat verarbeitet wird. Unter anaeroben Bedingungen wäre vorstellbar, dass der Schwefel aus Sulfid zunächst als Sulfanschwefel gespeichert wird.

Die SQR ist wahrscheinlich nicht nur für den Wattwurm ein wichtiges Enzym. In den Genomen sämtlicher Eukaryoten konnten Homologe identifiziert werden. Es ist bekannt, dass Sulfid endogen in Säugern gebildet wird, und eine Überproduktion bzw. unzureichende Entgiftung zu schwerwiegenden Erkrankungen führen kann.

Wahrscheinlich hatte der Vorfahre unserer Mitochondrien bereits eine SQR, denn zu der Zeit, als die ersten Eukaryoten entstanden sind, waren die tieferen Gewässer der Erdozeane sulfidisch und anoxisch. Die SQR ist also ein Relikt aus dieser Zeit, das aber wahrscheinlich auch heute noch von großer Bedeutung für viele Tiere ist, die in sulfidischem Milieu leben, aber auch für solche, die endogen Sulfid produzieren, das entgiftet werden muss.

Abstract

The lugworm *Arenicola marina* inhabits sulfide-rich marine sediments. It was shown for whole animals and isolated mitochondria, that the lugworm tolerates sulfide and the electrons from sulfide can be used for ATP-production. An enzyme similar to bacterial sulfide:quinone oxidoreductase (SQR), which transfers electrons from sulfide to ubiquinone, was postulated to be involved in the mitochondrial detoxification of sulfide.

In this work, the *sqr*-gene from *Arenicola marina* was isolated and successfully expressed in the mitochondrial membrane of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The protein was fused with six histidines for purification on a NiNTA-matrix.

In contrast to bacterial SQR, which was characterized in detail, the lugworm-SQR is active only in the presence of cyanide in millimolar concentrations. Lugworm SQR catalyzes the transfer of sulfur to cyanide with formation of thiocyanate, similar to the enzyme rhodanese. Cyanide could be replaced by micromolar concentrations of thioredoxin in combination with millimolar concentrations of sulfite.

Comparisons of the SQR protein sequences from the lugworm and other eukaryotes with bacterial SQRs revealed significant differences as well. Only three of five SQR fingerprints identified for bacterial SQR were conserved in all sequences, including two cysteines and a glycine in the FAD-binding domain III. Eukaryotic SQR lacks a third cysteine conserved in bacterial SQR and in the FAD-binding domain, eukaryotic sequences possess a conserved aspartate instead of valine.

Six amino acids conserved in all eukaryotic SQRs were exchanged by site directed mutagenesis. None of the mutated enzymes showed detectable activity. Referring to the bacterial reaction mechanism, a mechanism for mitochondrial SQR is proposed.

Thiosulfate was proposed to be the main detoxification product of sulfide in whole animals and lugworm mitochondria. In this work, it was shown that thiosulfate is not produced by SQR directly. Probably, the enzyme binds sulfur as a persulfide, which can be transferred to thioredoxin or sulfurtransferases. In the presence of oxygen, the oxidation to thiosulfate by another enzyme is possible. Under anaerobic conditions, the sulfur from sulfide could be stored as sulfane-sulfur.

SQR is probably not only important for sulfide-exposed animals like the lugworm, as homologs were found in the genomes of many other eukaryotes. As sulfide is produced endogenously in mammals, and overproduction or insufficient detoxification leads to diseases, SQR might play an important role here.

Most likely, the ancestor of mitochondria possessed SQR, because the first eukaryotes existed at a time, when the ocean waters were sulfidic and anoxic. For the first eukaryotes SQR was essential, but even today it might be important for all eukaryotes.

DANKE . . .

Ich danke Herrn Prof. Dr. William Martin für die Aufnahme in seinem Institut und die Bereitstellung des Themas. Seine motivierende und aufmunternde Art, sowie seine Diskussionsbereitschaft über Sulfid, Sulfit, Cyanid, Rhodanase und Co. haben mir sehr bei der Überwindung von „Tälern“ geholfen und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Grieshaber möchte ich für die Übernahme der Rolle des Zweitgutachters danken. Ebenso danke ich ihm für sein Interesse an meiner Arbeit und für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg „Molekulare Physiologie: Stoff- und Energieumwandlung.“

Mein besonderer Dank gilt Claudia Kirberich. Gemeinsam haben wir mit den Hefen gekämpft, und sie musste so manche Eiszeit im Kühlraum verbringen!! Auch Margarete Stracke möchte ich für ihre technische Unterstützung danken.

Katrin Henze danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft und Hilfestellungen. Auch Meike Hoffmeister möchte ich für die freundliche Unterstützung bei Fragen rund um die Molekularbiologie und FPLC herzlich danken.

Simone Pütz, Silke Rosnowsky und Sara Tucci danke ich für die tolle Zusammenarbeit und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Auch den anderen Mitarbeitern des Instituts für Botanik III danke ich für die schöne gemeinsame Zeit.

Außerdem danke ich Gabriel Gelius-Dietrich für seine Geduld bei der Beantwortung bioinformatischer Fragen. Tatjana Przywara danke ich für zahlreiche „Sulfid-Diskussionen“ und gemeinsame „SQR-Kombinationsexperimente“.

Meiner Familie, vor allem meinen Eltern, möchte ich danken, da sie mich immer bedingungslos unterstützt haben.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank Andre, für sein Verständnis, seine Motivation und Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 28.10.2006

(Ursula Theißen)