

**Biochemische, strukturelle und kinetische  
Charakterisierung des ungewöhnlichen *c*-Typ  
Cytochroms Thiosulfatdehydrogenase**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

**Kevin Denkmann**

aus

Duisburg

Bonn 2014



Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: apl. Prof. Dr. Christiane Dahl

2. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier

Tag der Promotion: 11.02.2015

Erscheinungsjahr: 2015

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung .....	1
1.1.	Die Thiosulfatdehydrogenase.....	1
1.2.	Häme .....	3
1.2.1.	Ungewöhnliche Häm-Eisen Ligationen .....	5
1.3.	Thiosulfat .....	6
1.4.	Tetrathionat .....	7
1.5.	Der Organismus <i>Allochromatium vinosum</i> .....	10
1.6.	Der Organismus <i>Campylobacter jejuni</i> .....	10
1.7.	Ziel dieser Arbeit.....	11
2.	Material und Methoden .....	13
2.1.	Materialien .....	13
2.1.1.	Verwendete Chemikalien .....	13
2.1.2.	Verwendete Antibiotika .....	14
2.1.3.	Enzyme und Proteine .....	14
2.1.4.	Verwendete Nukleotide.....	15
2.1.5.	Verwendete Software .....	15
2.1.6.	Verwendete Geräte .....	16
2.1.7.	Verwendete Kits .....	17
2.1.8.	Bakterienstämme .....	17
2.1.9.	Oligonukleotide .....	17
2.1.10.	Plasmide .....	18
2.2.	Mikrobiologische Methoden .....	19
2.2.1.	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	20
2.2.2.	Präparation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	21
2.3.	Molekularbiologische Methoden.....	21
2.3.1.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	21
2.3.2.	GENE SOEING (gene splicing by overlap extensions) .....	22
2.3.3.	Visualisierung von DNA.....	23
2.3.4.	Aufreinigung von DNA aus dem Agarosegel .....	23
2.3.5.	Restriktionsverdau.....	23
2.3.6.	Alkalische Dephosphorylierung.....	23
2.3.7.	DNA Ligation.....	23
2.3.8.	DNA Präparation.....	24
2.3.9.	DNA Sequenzierung .....	24
2.3.10.	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	24

2.4.	Heterologe Produktion von Proteinen in <i>E. coli</i> .....	25
2.4.1.	Heterologe Produktion von AvTsdA und AvTsdA-Varianten in <i>E. coli</i> (Denkman et al. 2012) .....	25
2.4.2.	Heterologe Produktion von TintTsdB in <i>E. coli</i> .....	25
2.4.3.	Heterologe Produktion von Alvin_2879 in <i>E. coli</i> .....	25
2.4.4.	Heterologe Produktion von HiPIP (Alvin_2274) in <i>E. coli</i> .....	25
2.4.5.	Heterologe Produktion von CjTsdA (C8J_0815) in <i>E. coli</i> .....	26
2.4.6.	Zellaufschluss .....	26
2.5.	Proteinbiochemische Methoden .....	26
2.5.1.	Strep-Tag Affinitätschromatographie .....	26
2.5.2.	Entsalzung von Proteinen.....	26
2.5.3.	Konzentration von Proteinen.....	26
2.5.4.	SDS-PAGE .....	27
2.5.5.	Hämfärbung.....	27
2.5.6.	Coomassiefärbung .....	27
2.6.	Protein analytische Methoden .....	28
2.6.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test .....	28
2.7.	Chromatographische Methoden .....	28
2.7.1.	Gelfiltration über FPLC (fast protein liquid chromatography) .....	28
2.8.	Spektroskopische Methoden .....	29
2.8.1.	Bestimmung von Thiosulfat und Tetrathionat .....	29
2.8.2.	UV-Vis Spektroskopie – Aufnahme von Proteinspektren .....	29
2.8.3.	UV-Vis Spektroskopie – Thiosulfat-abhängige Reduktion von Ferricyanid... ..	29
2.8.4.	UV-Vis Spektroskopie – Thiosulfat-abhängige Reduktion von Pferdeherz Cytochrom <i>c</i> .....	29
2.8.5.	UV-Vis Spektroskopie – Thiosulfat-abhängige Reduktion von HiPIP (Alvin_2274).....	30
2.8.6.	UV-Vis Spektroskopie – Thiosulfat-abhängige Reduktion von TsdB (Tint_2893).....	30
2.8.7.	UV-Vis Spektroskopie – Thiosulfat-abhängige Reduktion von Alvin_2879 ..	30
2.8.8.	UV-Vis Spektroskopie – Tetrathionat-abhängige Oxidation von reduziertem Methylviologen.....	31
2.8.9.	EPR-Spektroskopie .....	31
2.8.10.	Redoxpotential-Bestimmung mit einer Goldelektrode.....	33
2.8.11.	Redoxpotential-Bestimmung mit Natriumdithionit .....	34
2.8.12.	Redoxpotential-Bestimmung mit optisch transparenter SnO <sub>2</sub> Elektrode.....	34
2.9.	Anaerobes Arbeiten.....	35
2.9.1.	Herstellung von Titan (III) citrat Lösung.....	35
2.10.	Kristallographie .....	35

3.	Ergebnisse .....	37
3.1.	Biochemische, kinetische und strukturelle Charakterisierung des AvTsdA Wildtyp-Proteins .....	37
3.1.1.	Struktur der Thiosulfatdehydrogenase aus <i>A. vinosum</i> .....	37
3.1.2.	Bestimmung des Redoxpotentials der AvTsdA Häme.....	39
3.1.3.	Spektroskopische Analyse des AvTsdA Wildtyp-Proteins .....	42
3.1.4.	Kinetische Charakterisierung des AvTsdA Wildtyp-Proteins .....	44
3.2.	TsdA Cystein <sub>96</sub> -Varianten .....	48
3.2.1.	Klonierung und Produktion von TsdA Cystein <sub>96</sub> -Varianten .....	48
3.2.2.	Spektroskopische Charakterisierung der TsdA Cystein <sub>96</sub> -Varianten .....	49
3.2.3.	Kinetische Charakterisierung der TsdA Cystein <sub>96</sub> -Varianten .....	55
3.3.	AvTsdA Lysin <sub>208</sub> - und Methionin <sub>209</sub> -Varianten .....	55
3.3.1.	Klonierung und Produktion der TsdA Lysin <sub>208</sub> - und TsdA Methionin <sub>209</sub> - <sup>Δ</sup> Varianten .....	56
3.3.2.	Struktur der TsdA-Varianten TsdAK <sub>208</sub> G und TsdAK <sub>208</sub> N .....	56
3.3.3.	Bestimmung des Redoxpotentials von TsdAK <sub>208</sub> G .....	58
3.3.4.	Spektroskopische Analyse der TsdA Lysin <sub>208</sub> -Varianten .....	59
3.3.5.	Spektroskopische Analyse von TsdAM <sub>209</sub> G .....	63
3.3.6.	Kinetische Charakterisierung von TsdAK <sub>208</sub> G, TsdAK <sub>208</sub> N und TsdAM <sub>209</sub> G .....	64
3.4.	Mögliche Elektronenakzeptoren der Thiosulfatdehydrogenase aus <i>A. vinosum</i> .....	68
3.4.1.	Pferdeherz Cytochrom <i>c</i> .....	68
3.4.2.	TsdB aus <i>Thiomonas intermedia</i> .....	69
3.4.3.	Alvin_2879 aus <i>A. vinosum</i> .....	72
3.4.4.	HiPIP (Alvin_2274) aus <i>A. vinosum</i> .....	73
3.5.	Biochemische und kinetische Charakterisierung der TsdA aus <i>C. jejuni</i> .....	76
3.5.1.	Klonierung und Produktion von C8j_0815 (CjTsdA) und C8j_0040 .....	76
3.5.2.	Spektroskopische Charakterisierung der CjTsdA .....	77
3.5.3.	Kinetische Charakterisierung der rekombinanten CjTsdA .....	78
3.5.4.	Wachstumsexperimente mit <i>C. jejuni</i> .....	79
3.6.	Mögliche Elektronenakzeptoren der CjTsdA.....	80
3.6.1.	Das TsdA-Homologe Protein C8j_0040 .....	80
3.6.2.	TsdB aus <i>T. intermedia</i> .....	81
3.6.3.	Pferdeherz Cytochrom <i>c</i> .....	82
3.7.	Das Fusionsprotein TsdA/TsdB aus <i>M. purpuratum</i> .....	84

4. Diskussion .....	86
4.1. Struktur der Thiosulfatdehydrogenasen .....	86
4.2. Katalytische Aktivität der Thiosulfatdehydrogenasen .....	87
4.3. Analyse der biochemischen Charakteristika von Häm 1 .....	90
4.4. Funktion von Häm 1 .....	94
4.5. Analyse der biochemischen Charakteristika von Häm 2 .....	96
4.6. Funktion von Häm 2.....	102
4.7. Mögliche Elektronenakzeptoren der Thiosulfatdehydrogenasen.....	105
4.8. Physiologische Charakterisierung der Thiosulfatdehydrogenasen .....	110
5. Zusammenfassung .....	113
6. Literaturverzeichnis .....	115
Anhang .....	131
Danksagung .....	132
Publikationen .....	134

**Abkürzungsverzeichnis**

Ap	Ampicillin
Ad	Auffüllen bis
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
AvTsdA	Thiosulfatdehydrogenase aus <i>Allochromatium vinosum</i>
BisTris	2,2-Bis(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrilotriethanol, 2-Bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxy-methyl)methan
Bp	Basenpaare
BSA	Bovin Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CjTsdA	Thiosulfatdehydrogenase aus <i>Campylobacter jejuni 81116</i>
Cm	Chloramphenicol
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ferricyanid	Kaliumhexocyanoferrat (III)
<i>g</i>	Gravitationskonstante
Gb	10 <sup>9</sup> Basen
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
HIIP	High-potential-iron-sulfur-protein
IPTG	Isopropyl-β-S-thiogalactosid
Kb	10 <sup>3</sup> Basen
kDa	10 <sup>3</sup> Dalton
MarpuTsdA/TsdB	Fusionsprotein der Thiosulfatdehydrogenasen A und B aus <i>Marichromatium purpuratum</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PstTsdA	Thiosulfatdehydrogenase aus <i>Pseudomonas stutzeri</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s. o.	siehe oben
TEMED	Tetramethyldiamin
T <sub>a</sub>	Annealingtemperatur
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur

Tm	Trademark
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TsdA	Thiosulfatdehydrogenase A
TsdAC <sub>96</sub> X	AvTsdA-Variante in der Cystein <sub>96</sub> durch eine andere Aminosäure ausgetauscht wurde
TsdAL <sub>208</sub> X	AvTsdA-Variante in der Lysin <sub>208</sub> durch eine andere Aminosäure ausgetauscht wurde
TsdAM <sub>209</sub> X	AvTsdA-Variante in der Methionin <sub>209</sub> durch eine andere Aminosäure ausgetauscht wurde
TsdB	Thiosulfatdehydrogenase B



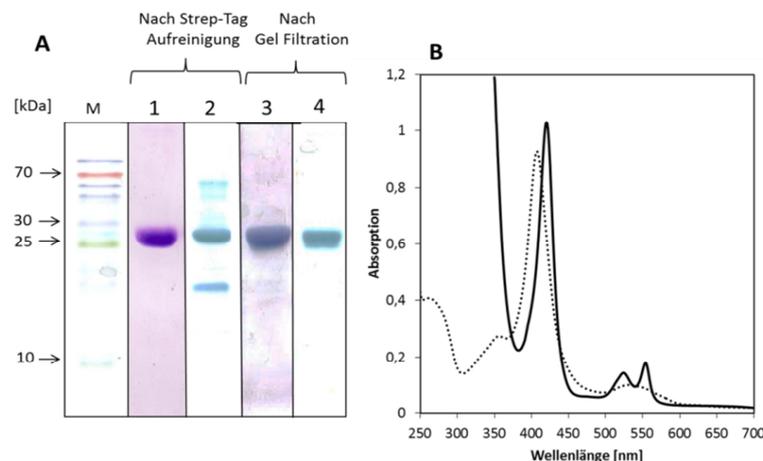
## 1. Einleitung

### 1.1. Die Thiosulfatdehydrogenase

Thiosulfat kann in *Allochrodatum vinosum* über zwei verschiedene Stoffwechselwege oxidiert werden. Es besteht die Möglichkeit der vollständigen Oxidation von Thiosulfat über das Sox-System zu Sulfat oder die unvollständige Ein-Schritt Oxidation zu Tetrathionat über die Thiosulfatdehydrogenase (Hensen et al. 2006).

Bei leicht saurem pH-Wert ist Tetrathionat das Hauptprodukt der Thiosulfat-Oxidation in *A. vinosum* (Smith 1966). Bereits 1961 wurde als verantwortliches Enzym für die Katalyse von zwei Molekülen Thiosulfat zu einem Molekül Tetrathionat die Thiosulfatdehydrogenase identifiziert (Trudinger 1961). In *A. vinosum* wurde erstmalig ein für die Thiosulfatdehydrogenase kodierendes Gen (*alvin\_0091*) identifiziert (Denkman et al. 2012).

Die Thiosulfatdehydrogenase (TsdA) aus *A. vinosum* ist ein monomeres 25,8 kDa großes, Dihäm *c*-Typ Cytochrom, welches im Periplasma lokalisiert ist. In Abbildung 1 A ist eine Häm- und Coomassiefärbung des Proteins vor und nach der Gelfiltration dargestellt. Diese Methode erhöht den Reinheitsgrad des rekombinant produzierten Proteins deutlich (siehe auch Abschnitt 3.2.1).



**Abbildung 1:** TsdA aus *A. vinosum*. A: Coomassie (Spalte 1 und 3) und Häm Färbung (Spalte 2 und 4) rekombinanter TsdA (jeweils 5 µg) nach der Aufreinigung über Streptactin Affinitätschromatographie (Spalte 1 und 2) und Gelfiltration (Spalte 3 und 4). M: Protein Prestained Marker New England Biolabs (Tabelle 3). B: UV-Vis Spektrum von rekombinantem TsdA im oxidierten (gepunktete Linie) und reduzierten (durchgehende Linie) Zustand in 20 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0.

Die TsdA aus *A. vinosum* weist ein *c*-Typ Cytochrom charakteristisches UV-Vis Spektrum auf (Abbildung 1 B). Bei einem pH-Optimum von pH 4,0 hat die TsdA eine hohe

spezifische Thiosulfatdehydrogenase-Aktivität von 28.600 U/mg mit Ferricyanid als artifiziellem Elektronenakzeptor. Erste Ergebnisse aus elektroparamagnetischer Resonanzspektroskopie (2.8.9) lassen die hoch konservierten Aminosäuren Cystein<sub>96</sub> und Methionin<sub>209</sub> als wahrscheinlichste Liganden der beiden Häme erscheinen. Damit würde es sich bei der TsdA um ein  $c$ -Typ Cytochrom mit ungewöhnlicher His/Cys-Ligation (1.2.1) handeln (Denkman et al. 2012).

Homologe der Thiosulfatdehydrogenase (TsdA) finden sich in Organismen der  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Proteobakterien, aber auch einigen Grampositiven (Denkman et al. 2012). In den Organismen *Parachlamydia acanthamoebae* und *Waddlia chondrophila*, Vertreter der Umweltchlamydien konnten ebenfalls *tsdA*-homologe Gene identifiziert werden (Koch 2012). Einige prominente Vertreter der Pseudomonaden enthalten Kopien des *tsdA*-Gens, wie *Pseudomonas stutzeri* und *Pseudomonas aeruginosa*, wo eine Enzymaktivität bei Wachstum auf Sulfid, Thiosulfat und Tetrathionat beobachtet werden konnte (Schook und Berk 1979). Auch bei dem marinen *Pseudomonas* *CHG7-3* wurde eine Thiosulfatdehydrogenase-Aktivität nachgewiesen (Sorokin 1993). Neben *P. aeruginosa* ist das  $\epsilon$ -Proteobakterium *Campylobacter jejuni* ein weiterer humanpathogener Organismus, der ein TsdA-Homolog enthält (Liu et al. 2013). Für die grampositiven Organismen *Bacillus brevis*, *Lysinibacillus sphaericus* und *Lysinibacillus fusiformis*, welche alle ein *tsdA*-homologes Gen enthalten, wurde noch keine Bildung von Tetrathionat nachgewiesen. Eher ungewöhnlich ist die Präsenz eines *tsdA*-homologen Gens in *Nitrobacter hamburgensis*, da hier die Verwendung von reduzierten Schwefelverbindungen bislang nicht beobachtet werden konnte. Allerdings enthält *N. hamburgensis* auch homologe Gene zu *soxXYZAB* (Starkenburger et al. 2008). Ähnliches wurde für *Cupriavidus metallidurans* dokumentiert (Janssen et al. 2010). Eine detailreiche Charakterisierung des Enzyms erfolgte für den Sulfid-Oxidierer *Thiobacillus W5* (Visser et al. 1996) und erst kürzlich für *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Kikumoto et al. 2013). In *ΔtsdA*-Mutanten von *A. vinosum* konnte gezeigt werden, dass diese nicht in der Lage waren Tetrathionat zu bilden (Denkman et al. 2012).

	110	120	130	140	150	
<i>Allochromatium vinosum</i>	-----PDFV	GNGLACRHCH	PGRDGEVGT	ANAAPFVGVV	GRFPQYSARH	110
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	-----PKNV	GNGLNCTNCH	LSG----GTT	AYASPWVGLS	GAFFEYRSRS	101
<i>Ralstonia pickettii</i>	-----PHNV	GNGLNCTSCH	LNG----GTT	PYASPWVGLT	AAFFEYRSRS	98
<i>Sideroxydans lithotrophicus</i>	-----KQYV	GNSLNCVNCH	LAS----GRK	ENSSPLWAA	VRYPAYRAKN	108
<i>Beggiatoa sp.</i>	-----KRYV	GNGLNCTNCH	LSE----GRK	ANAAPLWGAY	GMYPQYRGKN	133
<i>Campylobacter jejuni</i>	QAKDPKKRFA	GNNLSCSSCH	ANG----GSV	QNQSGFVGIW	ARFPQYNARG	129
<i>Thiomonas sp.</i>	-----KDFV	GNTLSCVNCH	TDA----GRM	AGSAPLWAA	VSYPAYRGKN	113
<i>Thiomonas intermedia</i>	-----KDYV	GNTLSCVNCH	TDA----GRM	AGSAPLWAA	VSYPAYRGKN	120

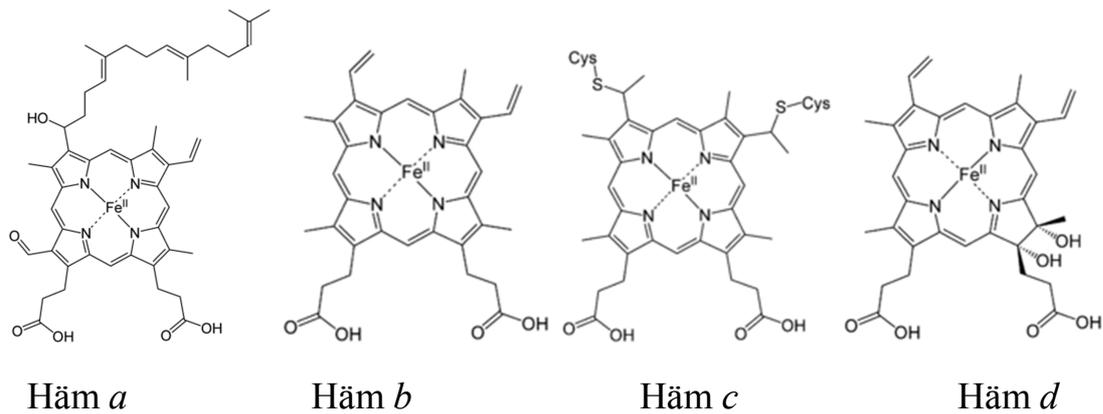
	160	170	180	190	200	
<i>Allochro-matium vinosum</i>	GRLITLQRI	GD <b>C</b> FERSLNG	RALALDHPAL	IDMLAYMSWL	SQGVVPGAVV	160
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	GKLISLQERV	ND <b>C</b> FQRSMNG	KPLAFDSAEM	NAIMAYMKWL	STGVVPGTNN	151
<i>Ralstonia pickettii</i>	GAVISLQQRV	ND <b>C</b> FQRSMNG	KPIAFDGEDM	NAILAYMKWL	SSGVVPGTNN	148
<i>Sideroxydans lithotrophicus</i>	NKVN <b>T</b> YEERI	Q <b>G</b> CFK <b>F</b> YSLNG	KAPAVDSPEM	VALVTYSYWL	ATGAPVGA <b>K</b> L	158
<i>Beggiatoa sp.</i>	REVV <b>T</b> FQERI	Q <b>D</b> CFK <b>F</b> YSLDG	IAPTVDSP <b>E</b> M	EALIA <b>Y</b> AH <b>W</b> L	SKGVVPGV <b>L</b> L	183
<i>Campylobacter jejuni</i>	DKVITLADRI	NG <b>C</b> FERSMNG	KRMPSDTP <b>E</b> M	KAMLT <b>Y</b> MQ <b>W</b> L	SQGVVPG <b>A</b> KI	179
<i>Thiomonas sp.</i>	KKVNT <b>F</b> EERL	Q <b>G</b> CF <b>F</b> K <b>F</b> SQNG	KAPPLGSK <b>T</b> L	VALESYSY <b>W</b> L	SKGLPVDE <b>K</b> V	163
<i>Thiomonas intermedia</i>	KKVNT <b>F</b> EERL	Q <b>G</b> CF <b>F</b> K <b>F</b> SQNG	KAPPLGSK <b>T</b> L	VALESYSY <b>W</b> L	SKGLPVDE <b>K</b> V	170
	210	220	230	240	250	
<i>Allochro-matium vinosum</i>	AGHGIP <b>T</b> L-T	LEREPDGV <b>H</b> G	EALYQAR <b>C</b> LA	<b>C</b> HGADGSG <b>T</b> L	DADG--RY-L	206
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	TGRGF <b>E</b> KI-D	TALV <b>N</b> REH <b>G</b>	KAVYAAQ <b>C</b> AS	<b>C</b> HGADGQ <b>G</b> MK	NPQ <b>G</b> --GY-V	197
<i>Ralstonia pickettii</i>	TGRGF <b>E</b> KI-D	TALAP <b>N</b> RD <b>N</b> G	KAVYAQR <b>C</b> AA	<b>C</b> HGAEGQ <b>G</b> LP	HPQ <b>G</b> --GY-L	194
<i>Sideroxydans lithotrophicus</i>	KGAGY <b>P</b> EV <b>P</b> K	PGLIPDAN <b>R</b> G	KTVF <b>V</b> ENC <b>Q</b> V	<b>C</b> HGSNGE <b>G</b> K	VDG <b>K</b> ---Y-I	204
<i>Beggiatoa sp.</i>	PGNG <b>F</b> TPV-N	RTRAP <b>S</b> T <b>E</b> NG	EILY <b>K</b> T <b>Q</b> C <b>A</b> M	<b>C</b> HG <b>K</b> DGL <b>G</b> Y <b>K</b>	YEDDRPGY-M	231
<i>Campylobacter jejuni</i>	EGQGL <b>K</b> KID <b>F</b>	ISRAAD <b>P</b> KK <b>G</b>	KAIYMD <b>K</b> CA <b>V</b>	<b>C</b> HQENGL <b>G</b> L <b>K</b>	NEDSAGAY <b>L</b>	229
<i>Thiomonas sp.</i>	AGRGY <b>P</b> N <b>L</b> PE	PQ <b>Q</b> APD <b>Y</b> VR <b>G</b>	QKVY <b>E</b> AK <b>C</b> IL	<b>C</b> H <b>A</b> ANG <b>E</b> G <b>Q</b> Y	VNG <b>E</b> ---T-V	209
<i>Thiomonas intermedia</i>	AGRGY <b>P</b> N <b>L</b> PE	PQ <b>Q</b> APD <b>Y</b> VR <b>G</b>	QKVY <b>E</b> AK <b>C</b> IL	<b>C</b> H <b>A</b> ANG <b>E</b> G <b>Q</b> Y	VNG <b>E</b> ---T-V	216
	260	270	280	290	300	
<i>Allochro-matium vinosum</i>	FPPLWG <b>P</b> RS <b>F</b>	NTGAGM <b>N</b> R <b>Q</b> A	TAA <b>G</b> F <b>I</b> K <b>H</b> K <b>M</b>	PLGADDS <b>L</b> S <b>D</b>	EEAWDVAG <b>F</b> V	256
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	FPPVWG <b>K</b> D <b>S</b> F	NIGAGM <b>A</b> R <b>M</b> Y	TAA <b>A</b> F <b>V</b> K <b>H</b> N <b>M</b>	PLGQGG <b>T</b> L <b>S</b> A	QD <b>A</b> LDV <b>S</b> A <b>F</b> F	247
<i>Ralstonia pickettii</i>	MPPLWG <b>K</b> D <b>S</b> F	NVGAGM <b>A</b> R <b>M</b> Y	TAA <b>A</b> F <b>V</b> K <b>H</b> N <b>M</b>	PLGQGG <b>T</b> L <b>T</b> A	QE <b>A</b> VDV <b>A</b> A <b>F</b> F	244
<i>Sideroxydans lithotrophicus</i>	FPPLWG <b>S</b> E <b>S</b> F	NWGAGM <b>H</b> R <b>I</b> N	TAA <b>A</b> F <b>I</b> K <b>A</b> N <b>M</b>	PLSKG <b>G</b> T <b>L</b> T <b>D</b>	QE <b>A</b> WDV <b>A</b> T <b>F</b> V	254
<i>Beggiatoa sp.</i>	FPPLWG <b>S</b> D <b>S</b> F	NRAAGM <b>N</b> K <b>V</b> K	TAA <b>Q</b> F <b>I</b> K <b>A</b> N <b>M</b>	PLGRG <b>F</b> T <b>L</b> T <b>D</b>	NE <b>A</b> VDI <b>A</b> Y <b>M</b>	281
<i>Campylobacter jejuni</i>	YPPLWG <b>D</b> D <b>S</b> Y	NTGAGM <b>Y</b> R <b>L</b> I	KA <b>A</b> S <b>Y</b> I <b>K</b> E <b>N</b> M	PQ <b>G</b> A <b>P</b> -D <b>L</b> S <b>L</b>	ED <b>A</b> YD <b>V</b> A <b>A</b> Y <b>M</b>	278
<i>Thiomonas sp.</i>	FPPLWG <b>P</b> K <b>S</b> F	NWGAGM <b>S</b> Y <b>K</b>	NA <b>A</b> K <b>F</b> I <b>Y</b> A <b>N</b> M	PY <b>G</b> M <b>S</b> Y <b>S</b> L <b>S</b> P	QE <b>A</b> WDV <b>A</b> Y <b>F</b> M	259
<i>Thiomonas intermedia</i>	FPPLWG <b>P</b> K <b>S</b> F	NWGAGM <b>S</b> Y <b>K</b>	NA <b>A</b> K <b>F</b> I <b>Y</b> A <b>N</b> M	PY <b>G</b> M <b>S</b> Y <b>S</b> L <b>S</b> P	QE <b>A</b> WDV <b>A</b> Y <b>F</b> M	266

**Abbildung 2:** Vergleichende Sequenzanalyse von Thiosulfatdehydrogenasen verschiedener Organismen. Die Nummerierung über der Sequenz gibt die Gesamtanzahl alignter Aminosäuren an, die Nummerierung hinter den Sequenzen die Anzahl der Aminosäuren des einzelnen Organismus. Rot hervorgehoben sind die hoch konservierten Aminosäuren C<sub>96</sub> und M<sub>209</sub>, welche als mögliche distale Liganden der Häme gelten, sowie die beiden Häm-Bindemotive. Die Sequenzanalyse wurde mit BLAST und Bioedit durchgeführt (Tabelle 5).

In Abbildung 2 ist ein Alignment von TsdAs aus verschiedenen Organismen dargestellt. Wichtige Charakteristika sind zwei Häm-bindemotive, sowie die stark konservierten Aminosäuren Cystein und Methionin, welche mögliche Liganden der gebundenen Häme sind.

## 1.2. Häme

Häme sind definiert als Protophyrin-Molekül, welches ein zentrales Eisenatom bindet. Häme bilden eine prosthetische Gruppe und kommen in vier verschiedenen Varianten, die sich in ihrer Struktur unterscheiden (Häm *a*, *b*, *c* und *d*) und seltenen Variationen dieser vor (Abbildung 3).

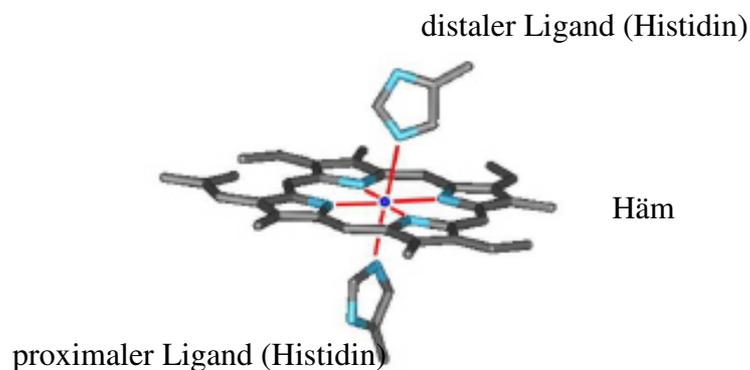


**Abbildung 3:** Häm *a*, *b*, *c* und *d*, modifiziert nach Abbildung 1.10 aus Pettigrew und Moore 1987.

Eine große Anzahl an Proteinen kann Häme binden, dazu zählen Katalasen, Peroxidasen und Cytochrome. Ein Cytochrom ist definiert als Protein, welches Häm bindet und Wasserstoff und Elektronen überträgt (Lemberg und Barrett 1973). Allerdings haben einige Cytochrome auch als vorrangige Funktion die Katalyse, z. B. die *b*-Typ enthaltenen Cytochrome Häm-Protein P450 und die Nitritoxid-Synthase (Hasler 1999; Alderton et al. 2001). Ein weiteres wichtiges Charakteristikum neben der Struktur, ist die Häm-(Eisen) Ligation. Diese beeinflusst das Redoxpotential von Cytochromen maßgeblich (Battistuzzi et al. 2002), welches üblicherweise zwischen - 500 und + 450 mV liegt (Reedy et al. 2007). Die vier Stickstoffmoleküle des Porphyrinrings ligieren das Eisenatom, sodass dieser flach in dem Protein liegt. Zwei weitere axiale Ligandenpositionen, können von Aminosäuren des Proteins besetzt werden. Häm *c* bindende Proteine sind durch ein CXXCH Häm-Bindemotiv charakterisiert, wobei die beiden Cysteine als Linker Thioetherbindungen mit dem Häm eingehen. Allerdings wurde erst vor kurzem in der Hydroxylamin-Oxidoreduktase aus dem Annamoxbakterium *Kuenenia stuttgartiensis* ein Häm identifiziert, das kovalent über ein Tyrosin an das Protein gebunden ist (Maalcke et al. 2014). Das Histidin des Hämbindemotivs bildet den proximalen axialen Liganden und auf der Gegenseite kann sich ein sechster axialer distaler Ligand befinden, sodass das Eisenatom in einem oktaedrischen Komplex gebunden ist. Bei fehlenden sechsten Liganden handelt es sich um ein „high-spin“ Häm. Dieses ist definiert als Häm mit einem schwachen oder fehlenden Liganden. Bei einem starken sechsten Liganden handelt es sich um ein „low spin“ Häm, z. B. mit einer His/His- oder His/Met-Ligation. Für eine allgemeine Definition zu „high spin“ und „low spin“ siehe Abschnitt 2.8.9 EPR-Spektroskopie.

### 1.2.1. Ungewöhnliche Häm-Eisen Ligationen

Gewöhnlich werden *c*-Typ Häme His/His- (Abbildung 4) oder His/Met-koordiniert (Cheesman et al. 1997), wobei die häufigste Häm-Eisen Ligation in *c*-Typ Cytochromen eine His/His-Koordination ist (Bandeiras et al. 2005). Eher seltener sind Met/Met-Ligationen so z. B. in einem streptococcalen Zelloberflächen-Protein, bei dem Methionin als axialer und distaler Ligand fungiert (Ran et al. 2007). Einige wenige Proteine weisen Variationen des Häm-Bindemotivs zu  $CX_{15}CH$  oder sogar  $CXXCK$  auf (Einsle 2000; Hartshorne et al. 2007). Lysin agiert als proximaler Häm-Ligand im  $CXXCK$ -Motiv der katalytisch aktiven Domäne der *Wolinella succinogens* Stickstoffreduktase (Einsle 2000).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung einer His/His-Koordination eines Hämes, modifiziert nach Grein et al. 2010.

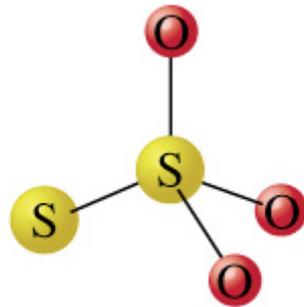
Variationen an dem distalen Liganden sind zahlreicher und häufiger als Veränderungen des proximalen Häm-Eisen Liganden. Erstmals wurde eine ungewöhnliche His/Cys-Häm-Eisen-Koordination beim SoxXA-Protein von *Rhodovulum sulfidophilum* beschrieben. Bis jetzt ist SoxXA das einzige Protein, bei dem der Cystein-Ligand persulfuriert vorliegt und das Häm-Eisen über ein Thiolat koordiniert wird (Cheesman et al. 2001). In *A. vinosum* wurde für das DsrJ-Protein eine ungewöhnliche His/Cys-Koordination ohne Persulfurierung eines Hämes nachgewiesen (Grein et al. 2010). Dieser sehr seltene Fall einer Häm-Eisen Ligation wurde auch für das grüne Häm-Protein von *Halochromatium salexigens* (van Driessche et al. 2006), ein Trihäm Cytochrom *c* in *Rhodovulum sulfidophilum* (Alric et al. 2004), den NaxLS-Cytochromkomplex in Annamoxbakterien (Ukita et al. 2010), einen bakteriellen Eisenresonanz-Regulator in *Bradhyrhizobium japonicum* (Ishikawa et al. 2011) und das PsbV2-Cytochrom des Cyanobakteriums *Thermosynechococcus elongates* (Suga et al. 2013) gezeigt. Für das PsbV2-Protein konnte dazu eine Kristallstruktur erstellt werden (Suga et al. 2013). Noch seltener als His/Cys-koordinierte

Häme sind alternative Ligationen mit den Aminosäuren Aspartat, Tyrosin, Asparagin oder Lysin. In dem Hämoglobin des IsdB-Rezeptor von *Staphylococcus aureus* wurde eine ungewöhnliche Met/Tyr-Ligation eines Hämes beobachtet (Gaudin et al. 2011). Auch Aspartat ist ein möglicher distaler Ligand von Häm-Eisen wie z. B. in dem NrfH-Protein von *Desulfovibrio vulgaris*. Allerdings ist Aspartat ein sehr schwacher Ligand, sodass das Häm dieser Chinoldehydrogenase als fünffach koordiniert gilt und der proximale Ligand, das Methionin eines seltenen CXXCHXM Motivs ist (Rodrigues et al. 2006). Eine vergleichbare Situation wurde für eine Hydroxylamin-Oxidoreduktase im Annamoxbakterium *Kuenenia stuttgartiensis* gefunden, bei der innerhalb des Octahäm Cytochroms ein Aspartat den distalen Liganden des katalytisch aktiven Hämes bildet (Maalcke et al. 2014). Auch das Cytochrom *c* SHP von *Rhodobacter sphaeroides* ist im reduzierten Zustand fünffach koordiniert, während im oxidierten Zustand Asparagin als sechster distaler Ligand fungiert und bei Reduktion unter Änderung der Konformation des Proteins eine Wasserstoffbindung eingeht (Leys 2000). In *Paracoccus pantotrophus* konnte ein Ligandenwechsel bei einem Häm des Cytochroms *cd1* von einer His/His- zu einer His/Met-Koordination nachgewiesen werden, wenn das Protein reduziert wurde (van Wonderen et al. 2007). Diese Art des Ligandenwechsels wurde außerdem bei Pferdeherz Cytochrom *c* beobachtet. Allerdings änderte sich bei diesem Cytochrom der Ligand mit dem pH-Wert. Bei pH 7,0 oder einem saurem pH-Wert ist das Häm des Monohäm Proteins Pferdeherz Cytochrom *c* His/Met-koordiniert und bei alkalischem pH-Wert führt eine Änderung der Proteinkonformation zu einer His/Lys-Koordination (Schweitzer-Stenner et al. 2007; Verbaro et al. 2009). Dabei fällt auf, dass Lysin immer nur als Ligand des katalytisch aktiven Hämes beobachtet werden konnte. Insgesamt zeigt sich, dass es eine Reihe von Aminosäuren gibt, welche die Fähigkeit haben Häm-Eisen zu koordinieren und die Enzymaktivität zu teilweise unerwarteten Ligandenwechseln führt. Die Thiosulfatdehydrogenase ist mit vermuteter His/Cys-Koordination eines Hämes ein weiterer Kandidat für die Liste der Proteine mit ungewöhnlichen Häm-Eisen Ligation. Die TsdA gleicht damit direkt in zweifacher Hinsicht den SoxXA-Proteinen, die alle eine ungewöhnliche His/Cys-Ligation eines Hämes besitzen und Thiosulfat als Substrat verwenden (Kappler et al. 2008).

### 1.3. Thiosulfat

Thiosulfat ist ein Substrat der Thiosulfatdehydrogenase Thiosulfat ist das Anion der Thioschwefelsäure und besteht aus zwei Schwefelatomen und drei Sauerstoffatomen

(Abbildung 5). Im basischen Milieu ist Thiosulfat stabil, während es bei sauren Bedingungen langsam zu Schwefeldioxid, Schwefel und Wasser zerfällt.

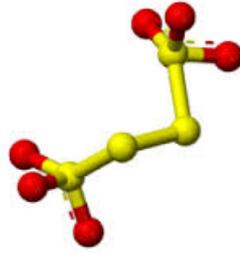


**Abbildung 5: Das Thiosulfat Anion.** Modifiziert nach [www.bio.davidson.edu](http://www.bio.davidson.edu).

Thiosulfat ist nur in geringem Maße in der Umwelt vorzufinden, spielt aber eine wichtige Rolle im Schwefelkreislauf. Zum Beispiel wird Thiosulfat in Bakterien der Ordnung der Thermotogales zu Sulfid reduziert und nimmt damit eine entscheidende Rolle im geochemischen Zyklus von Schwefel in anaeroben, thermischen Milieus mit leicht saurem oder neutralen pH-Wert ein (Ravot et al. 1995). Sulfid bildet auch das Endprodukt der Disproportionierung von Thiosulfat zu Schwefel, Sulfid und Wasser (Jørgensen 1990). Viele phototrophe und chemotrophe Organismen können unter aeroben oder anaeroben Bedingungen reduzierte Schwefelverbindungen wie Thiosulfat zu Sulfat oder Tetrathionat oxidieren. Bei der Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat bilden einige Bakterien als Intermediat Schwefelglobuli aus (Cohn 1875; Cramer 1870; Winogradsky 1887). Zum Beispiel wird in *A. vinosum* Schwefel in Form von Schwefelglobuli intermediär in den Zellen eingelagert (Dahl et al. 2008; Hensen et al. 2006). Die Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat findet als zweiter Stoffwechselweg, neben der vollständigen Oxidation zu Sulfat, in *A. vinosum* statt und wird durch die Thiosulfatdehydrogenase katalysiert (Hensen et al. 2006; Denkmann et al. 2012). Neben Thiosulfat kann dieses Enzym auch Tetrathionat als Substrat nutzen und die reverse Reaktion der Tetrathionat-Reduktion katalysieren (Liu et al. 2013).

#### 1.4. Tetrathionat

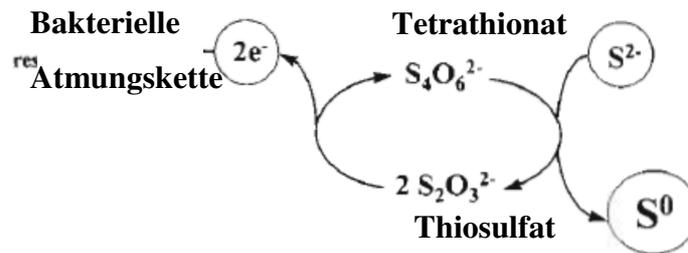
Tetrathionat ist eine Polythionsäure, die aus zwei Schwefelatomen der Oxidationsstufe null und zwei Schwefelatomen der Oxidationsstufe fünf und sechs Sauerstoffatomen besteht (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Struktur von Tetrathionat. Schwefelatome sind gelb und Sauerstoffatome rot dargestellt. Licensed under Public domain via Wikimedia Commons <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tetrathionate-3D-balls.png#mediaviewer/File:Tetrathionate-3D-balls.png>

Tetrathionat ist an einer Reihe von chemischen Reaktionen beteiligt und kann unter anderem in einer asymmetrischen Hydrolyse zu Thiosulfat, elementarem Schwefel und Sulfat zerfallen (Holleman und Wiberg 1998). Außerdem kann Tetrathionat mit Sulfid zu elementarem Schwefel und Thiosulfat reagieren (Roy und Trudinger 1970). Die disproportionierte Hydrolyse zu Thiosulfat wird in einigen Bakterien und Archaea von Tetrathionat-Hydrolasen katalysiert. Im Sulfatoxidierer *Acidithiobacillus ferrooxidans* ermöglicht das Enzym Af-Tth (*Acidithiobacillus ferrooxidans* Tetrathionat-Hydrolase) die Reaktion von Tetrathionat zu Thiosulfat, elementarem Schwefel und Sulfat (Kanao et al. 2013). In dem Archaeon *Acidianus hospitalis* wird eine Tetrathionat-Hydrolase in Form von virusartigen Partikeln sekretiert (Krupovic et al. 2012) und auch im Archaeon *Acidianus ambivalens* ist eine extrazelluläre Tetrathionat-Hydrolase vorzufinden (Protze et al. 2011).

In marinen Bakterien ist Tetrathionat dagegen ein wichtiges Oxidationsprodukt und nimmt eine zentrale Rolle im Schwefelstoffwechsel ein (Jørgensen 1990). Es wird ein Tetrathionatszyklus vorhergesagt, in dem katalytische Prozesse der marinen Organismen und chemische Prozesse eine Rolle spielen, sodass die Oxidation von Sulfid zu elementarem Schwefel in Anwesenheit von Thiosulfat und Tetrathionat ermöglicht wird (Podgorsek, L. und Imhoff 1999). Allerdings ist Tetrathionat eine nicht stabile Schwefelverbindung und kann nur akkumulieren, wenn die Neubildung schneller erfolgt als der chemische Zerfall. Kleine Mengen von Thiosulfat und Tetrathionat sind notwendig um die Gesamtoxidation von Sulfid zu elementarem Schwefel über bakterielle und chemische Reaktionen zu ermöglichen. Bakterien die nicht in der Lage sind Sulfid selbst zu nutzen, können von der vernetzten Oxidation von Sulfid zu elementarem Schwefel profitieren. Durch die chemische Reaktion von Tetrathionat und Sulfid zu zwei Molekülen Thiosulfat und elementarem Schwefel als finales Oxidationsprodukt, wird Thiosulfat als Substrat für Bakterien wiederhergestellt (Podgorsek, L. und Imhoff 1999) (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Der Tetrathionatszyklus. Tetrathionat und Thiosulfat bilden ein katalytisches Paar, während elementarer Schwefel das finale Oxidationsprodukt ist, das in den Sedimenten akkumuliert. Modifiziert nach (Podgorsek, L. und Imhoff 1999).

Bei nicht marinen Bakterien kann Tetrathionat mit verschiedenen Stoffwechselwegen in Verbindung gebracht werden. In *Halothiobacillus neopolitanus* (ehemals *Thiobacillus X* (Kelly und Wood 2000)) wurde schon 1958 von Trudinger ein Enzym beschrieben, dass die Reaktion von Thiosulfat zu Tetrathionat katalysiert (Trudinger 1958). Tetrathionat ist auch ein mögliches Intermediat in der Oxidation von Sulfid und Thiosulfat (Kuenen et al. 1992) bei mehreren Arten von Thiobacilli, z.B. *Thiomonas intermedia* (ehemals *Thiobacillus intermedius* (Moreira und Amils 1997)) oder *Thermithiobacillus tepidarius* (ehemals *Thiobacillus tepidarius* (Kelly und Wood 2000)). In *Methylophaga thiooxidans* ist Tetrathionat das Endprodukt der Dimethylsulfid-Oxidation. Die Oxidation von exogenem Thiosulfat zu Tetrathionat ist dabei der finale Oxidationsschritt und führt zu der Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) (Boden et al. 2010).

Tetrathionat hat noch weiter an Bedeutung gewonnen seitdem bekannt ist dass das Humanpathogen *S. typhimurium* während einer verursachten Entzündung, eine Wirtsgetriebene Bildung von Tetrathionat aus Thiosulfat über reaktive Sauerstoff-Radikale auslöst (Winter et al. 2010). Als terminaler Elektronenakzeptor wird hier Tetrathionat über die Tetrathionatreduktase TtrABC genutzt und gibt den Bakterien so einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Organismen der Darmflora, welche dieses Enzym nicht besitzen. Außerdem erlaubt die Tetrathionat-Atmung die Nutzung von spezifischen nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen, wie Ethanolamin, was einen zusätzlichen Vorteil für das Darmbakterium *S. typhimurium* darstellt (Thiennimitr et al. 2011). Auch andere Darmpathogene wie *Citrobacter* können Tetrathionat veratmen (Kaprálék 1972), was Tetrathionat eine umfassende Bedeutung in dem Stoffwechsel pathogener Organismen verleiht.

Aus diesem Grund sollte neben dem Modellorganismus *Allochromatium vinosum*, in dem erstmalig eine Thiosulfatdehydrogenase identifiziert wurde, der humanpathogene Organismus *Campylobacter jejuni*, der ebenfalls ein TsdA-Homolog enthält, untersucht werden.

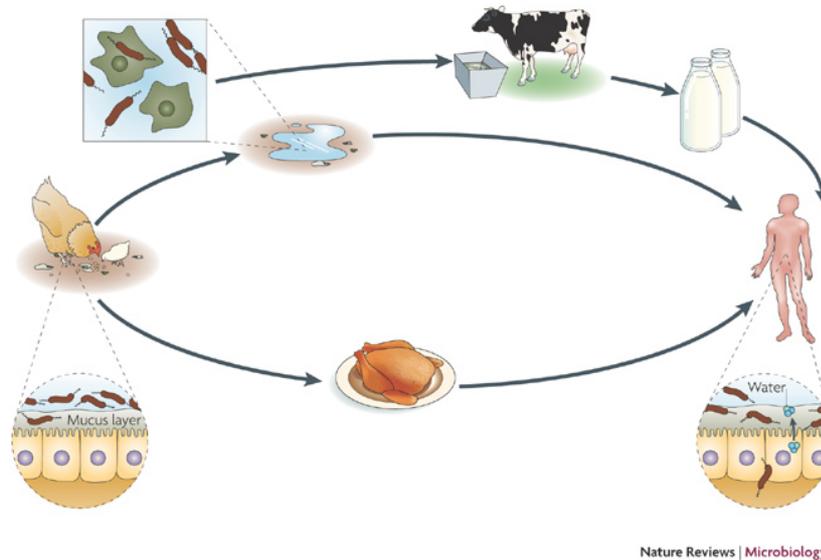
### 1.5. Der Organismus *Allochromatium vinosum*

*Allochromatium vinosum* ist ein Schwefelpurpurbakterium, gehört zu den Gammaproteobakterien und zu der Klasse der Chromatiaceae (Imhoff et al. 1998). *A. vinosum* kommt in Sulfid-haltigen Gewässern und Sedimenten, aber auch in marinen Ökosystemen vor. Es handelt sich bei dem Organismus um ein gramnegatives, stäbchenförmiges und monopolar begeißeltes Bakterium, welches unter anoxischen Bedingungen in der Lage ist photolithoautotroph oder photoorganoheterotroph zu wachsen. Bei mikro- bis semioxischen Bedingungen ist *A. vinosum* auch zu einem chemoautotrophen Stoffwechsel mit Malat als Elektronendonator befähigt (Kämpf und Pfennig 1980). Weitere Elektronendonatoren, zur CO<sub>2</sub>-Fixierung über den reduktiven Pentosephosphatweg bei phototrophen Wachstum, sind neben reduzierten Schwefelverbindungen auch elementarer Wasserstoff, Formiat und Pyruvat (Pfennig 1992; Brune 1989). Die Flexibilität des Stoffwechsels und die Möglichkeit der genetischen Manipulation machen *A. vinosum* zu einem geeigneten Modellorganismus. Zudem ist seit 2011 das komplette, 3,6 Gb große Genom des Organismus mit 3302 Annotationen für Protein-kodierende und 64 für RNA-kodierende Gene veröffentlicht (Weissgerber et al. 2011).

### 1.6. Der Organismus *Campylobacter jejuni*

*Campylobacter jejuni* gehört zu den  $\epsilon$ -Proteobakterien und ist ein mikroaerophiles, gramnegatives, spiralgiges Stäbchen mit bipolarer, monotricher Begeißelung. *C. jejuni* ist Teil der Darmflora vieler Vogel- und Tierarten und verursacht mehr humane Lebensmittelvergiftungen als Salmonellen. Ein großes Gesundheitsproblem und Hauptursache für humane Campylobacteriose und verantwortlich für über 70 % aller Infektionen ist nicht gar gekochtes Huhn. In der Darmflora von Hühnern ist *C. jejuni* ein üblicher Vertreter, doch im Menschen ein mukosales intestinales Pathogen, welches akute blutige Diarrhoe mit Bauchkrämpfen und Fieber verursachen kann. Eine signifikante Anzahl von Infektionen (0,1 %) führt zu dem Guillain-Barré Syndrom, welches über neuromuskuläre Paralyse zum Tod führen kann (Nachamkin et al. 2008). In Abbildung 8 ist der Übertragungsweg von *C. jejuni* auf den Menschen dargestellt. Der entscheidende Unterschied zum Hühn-

chen ist, dass die Epithelzellen des menschlichen Darmes keine Barriere für *C. jejuni* darstellen, wodurch der Organismus zum Pathogen wird (Young et al. 2007).



**Abbildung 8:** Ursachen der Übertragung von *Campylobacter jejuni* auf den Menschen (Young et al. 2007).

*C. jejuni* besitzt ein relativ kleines Genom von 1,7 Mb und enthält trotzdem ein sehr komplexes Elektronentransportsystem (Sellars et al. 2002; Nachamkin et al. 2008). Bei mikroaeroben Wachstum werden Elektronen von Elektronendonoren mit niedrigem Redoxpotential zu Menachinon oder Methylmenachinon (Juhnke et al. 2009; Guccione et al. 2010) und anschließend zu einer von zwei terminalen Oxidasen, entweder direkt zu der Chinoloxidase CioAB oder über den Protonen-translozierenden Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplex und Cytochrom *c* zur *cb*-Oxidase geleitet (Jackson et al. 2007). Stoffwechselwege mit einer Vielfalt von alternativen Elektronenakzeptoren wie Fumarat (Sellars et al. 2002; Weingarten et al. 2009; Guccione et al. 2010), Nitrat und Nitrit (Pittman et al. 2007), Trimethylamin N-oxid (TMAO) und Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sellars et al. 2002) konnten identifiziert werden.

### 1.7. Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Struktur und Funktionsweise der Thiosulfatdehydrogenasen aufgeklärt werden. Am Beispiel der TsdA-Proteine aus *A. vinosum* und *C. jejuni* sollten biochemische, kinetische und strukturelle Erkenntnisse über diese Enzymklasse gewonnen werden. Damit eine umfassende Analyse der Thiosulfatdehydrogenasen gewährleistet werden konnte, sollten im Rahmen von mehreren Bachelorarbeiten TsdA-Proteine aus verschiedenen weiteren Organismen charakterisiert und in Bezug zu den Enzymen aus *A. vinosum* und *C. jejuni* gesetzt werden.

Ein Fokus wurde auf die Häm-Eisen Koordination dieser *c*-Typ Cytochrome gelegt. Anhand von UV-Vis Spektren und über die Erstellung verschiedener AvTsdA-Varianten sollten Erkenntnisse über die Häm-Ligation des Dihäm Cytochroms gewonnen werden. In Kooperation mit Arbeitsgruppen aus Portugal und England, sollten die Struktur und das Redoxpotential der TsdA aus *A. vinosum* bestimmt werden.

Des Weiteren sollte der endogene Elektronenakzeptor der TsdA-Proteine aus *A. vinosum* und *C. jejuni* identifiziert werden. Dazu wurden verschiedene Kandidatenproteine heterolog in *E. coli* produziert und getestet, ob diese *in vitro* als Elektronenakzeptor der TsdA-Proteine fungieren können.

Im Rahmen einer Kooperation sollten Erkenntnisse über die *in vivo* Funktionsweise der TsdA des pathogenen Organismus *C. jejuni* gewonnen werden. Dazu wurden eine  $\Delta$ *tsdA*-Deletionsmutante und eine  $\Delta$ *tsdA/tsdA*<sup>+</sup>-Komplementationsmutante erstellt und vergleichende Wachstumsversuche mit den Mutanten durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Verwendete Chemikalien

**Tabelle 1: Verwendete Chemikalien**

Name	Firma	Sitz in Deutschland
2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Sigma-Aldrich	Hamburg
Acrylamid	Carl Roth GmbH+Co. KG GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Bis-Tris	Sigma-Aldrich	Hamburg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	Hamburg
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blau G	Sigma-Aldrich	Hamburg
L-Cystein	Merck KGaA	Darmstadt
D-Desthiobiotin	IBA	Göttingen
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
EDTA	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Eisensulfat	Merck KGaA	Darmstadt
Eisessig	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Formaldehydlösung (37 %)	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
GelRed Nucleic Acid Stain (10.000 x in Wasser)	Biotium/VWR	Harvard/Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
HCl	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
IPTG	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Kaliumcarbonat	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Kaliumhexacyanoferrat	VWR	Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat (II) - Trihydrat	Sigma-Aldrich	Hamburg
Kaliumtetrathionat	Merck KGaA	Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Maltose	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Methylviologen - Dichloridhydrat	Sigma-Aldrich	Hamburg
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich	Hamburg
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe

**Fortsetzung Tabelle 1: Verwendete Chemikalien**

Natriumcitrat	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Natriumdithionit	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Natriumthiosulfat - Pentahydrat	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
N-Z-Amine A from bovine milk	Sigma-Aldrich	Hamburg
Casein enzymatic hydrolysate	Sigma-Aldrich	Hamburg
Pepton tryptisch verdaut (Trypton)	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Saccharose	Sigma-Aldrich	Hamburg
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich	Hamburg
Strep-Tactin Superflow	IBA	Göttingen
Tris(2-carboxy-ethyl)phosphinchlorid (TCEP)	Sigma-Aldrich	Hamburg
TEMED	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Tetramethylbenzidin (TMBZ)	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Titan (III) - chlorid	Honeywell Specialty Chemicals	Seelze
Tris	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (30 %)	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe

*2.1.2. Verwendete Antibiotika***Tabelle 2: Verwendete Antibiotika**

<b>Name</b>	<b>Konzentration der Stammlösung</b>	<b>Firma (Ort)</b>
Ampicillin	100 mg/mL Wasser	Carl Roth GmbH+Co. KG (Karlsruhe)
Chloramphenicol	25 mg/mL Ethanol	Sigma-Aldrich (Hamburg)

*2.1.3. Enzyme und Proteine***Tabelle 3: Verwendete Restriktionsenzyme und Proteine**

<b>Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Sitz in Deutschland</b>
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH+Co. KG	Karlsruhe
CIAP	Thermo Scientific	Schwerte
Pferdeherz Cytochrom c	Sigma-Aldrich	Hamburg
<i>Eco47III</i>	Thermo Scientific	Schwerte
<i>EcoRV</i>	Thermo Scientific	Schwerte
<i>HindIII</i>	Thermo Scientific	Schwerte
<i>NcoI</i>	Thermo Scientific	Schwerte
<i>NdeI</i>	Thermo Scientific	Schwerte

**Fortsetzung Tabelle 3: Verwendete Restriktionsenzyme und Proteine**

Pfu-Polymerase	Thermo Scientific	Schwerte
Prestained Protein Ladder	New England Biolabs	München
Prestained Protein Marker	Thermo Scientific	Schwerte
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific	Schwerte
<i>Xba</i> I	Thermo Scientific	Schwerte
<i>Xho</i> I	Thermo Scientific	Schwerte

2.1.4. *Verwendete Nukleotide***Tabelle 4: Verwendete Nukleotide**

Name	Firma/Quelle	Sitz in Deutschland
dATP	Thermo Scientific	Schwerte
dCTP	Thermo Scientific	Schwerte
dGTP	Thermo Scientific	Schwerte
dTTP	Thermo Scientific	Schwerte
GeneRuler 1 kB DNA Ladder	Thermo Scientific	Schwerte
GeneRuler 100 Bp DNA Ladder	Thermo Scientific	Schwerte
chromosomale DNA von <i>Allochroamatium vinosum</i>	zur Verfügung gestellt von Renate Zigann	
chromosomale DNA von <i>Campylobacter jejuni</i>	NC_009839 (Arnoud van Vliet, Institute of Food Research; Nor- wich, England)	

2.1.5. *Verwendete Software***Tabelle 5: Verwendete Software unter Angabe von Hersteller/Quelle**

Software	Funktion - Hersteller/Quelle
Adobe Reader XI	Bilddarstellung - Adobe Acrobat (München)
BioEdit Sequence Alignment Editor	Sequenzvergleich - <a href="http://www.mbio.ncsu.edu">www.mbio.ncsu.edu</a>
BLAST	Nukleotid/Protein Datenbankrecherche - <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
Clone Manager 9	Sequenzanalyse - Sci-Ed Software
Clustal W	Sequenzvergleich - <a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html">http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html</a>
ExpASy	Bioinformatische DNA und Protein Analyse - <a href="http://www.expasy.org/">http://www.expasy.org/</a>
GraphPad Prism	Analyse und Darstellung kinetischer Daten - GraphPad Soft- ware (La Jolla, USA)

**Fortsetzung Tabelle 5: Verwendete Software unter Angabe von Hersteller/Quelle**

INTAS GDS	Visualisierung von Agarosegelen/Kontrolle der Geldokumentationsanlage INTAS (Göttingen)
KEGG	Nukleotid/Protein Datenbankrecherche - <a href="http://www.genome.jp/kegg/">http://www.genome.jp/kegg/</a>
Magellan Data Analysis Software	Steuerung des Infinite M200 – Tecan (Crailsheim)
Microsoft Office 2013	Text- und Datenbearbeitung – Microsoft (u. a. Berlin)
Photoshop Elements	Bildbearbeitung – Adobe Systems (München)
SignalP	Vorhersage von Signalpeptiden- <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services">http://www.cbs.dtu.dk/services</a> (Center for Biological Sequence Analysis)
Unicorn 5.0	Steuerung des Äkta Purifier (FPLC)- GE Healthcare (München)
UV WinLab 2.31	Steuerung des Lambda 11 - PerkinElmer (Hamburg)
UVProbe 2.10	Steuerung des UV-3100 – Shimadzu (Duisburg)
UV/VIS online	Steuerung des Agilent 8453 – Agilent Technologies (Waldbronn)
WinASPECT	Kontrolle des Specord 210 - analytikjena (Jena)

*2.1.6. Verwendete Geräte***Tabelle 6: Verwendete Geräte unter Angabe des Herstellers**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sitz in Deutschland</b>
5810 R (Zentrifuge)	Eppendorf	Hamburg
Agilent 8453 (Diodenarray – Photometer)	Agilent Technologies	Waldbronn
Äkta Purifier (FPLC)	GE Healthcare	München
Anaerobenzelt	Coy Laboratory Products	Göppingen (Töpffer Laborsysteme)
Biofuge 13 (Zentrifuge)	Heraeus	Hanau
Cell disruptor B15	Branson Sonifier	Dietzenbach
Centrifuge 5415R	Eppendorf	Hamburg
EMX spectrometer	Bruker Biospin	Karlsruhe
ESR 900 continuous-flow helium cryostat	Oxford Instruments	Uedem
GENESYS 20 (Photometer)	Thermo Scientific	Schwerte
Hera Safe (Sterilbank)	Heraeus	Hanau
Horizon 58 (Agarosegelelektrophorese Kammern)	Life Technologies	Darmstadt
Infinite M200 (Plattenlesegerät)	TECAN	Crailsheim
INTAS GDS (Geldokumentationsanlage)	INTAS	Göttingen
J20xP (Zentrifuge)	Beckman Coulter	Krefeld
J2-HS (Zentrifuge)	Beckman Coulter	Krefeld
Lambda 11 (Photometer)	PerkinElmer	Hamburg
Mini Protean (SDS-PAGE Kammern)	Biorad	München
Minitron (Inkubator)	Infors HT	Einsbach

**Fortsetzung Tabelle 6: Verwendete Geräte unter Angabe des Herstellers**

MyCycler	Biorad	München
Novaspecll (Photometer)	Pharmacia Biotech	Freiburg
Specord 210 (Photometer)	analytikjena	Jena
UV-3100 (UV/VIS-NMR Spectrophotometer)	Shimadzu	Duisburg

2.1.7. *Verwendete Kits***Tabelle 7: Verwendete Kits unter Angabe des Herstellers**

Kit	Funktion	Hersteller (Ort)
GeneJET™ Gel Extraction Kit #K0691/2	Aufreinigung von DNA	Thermo Scientific (Schwerte)
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit #K0503	Aufreinigung von Plasmiden	Thermo Scientific (Schwerte)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Bestimmung der Proteinkonzentration	Thermo Scientific (Schwerte)

2.1.8. *Bakterienstämme***Tabelle 8: Verwendete Bakterienstämme unter Angabe des Genotyps**

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> DH5α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Hanahan 1983
<i>E. coli</i> BL21 DE3	<i>B dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal</i>	Novagen (Darmstadt)
<i>E. coli</i> C43 DE3	<i>F<sup>-</sup> ompT gal dcm hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)(DE3)</i>	Novagen (Darmstadt)
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168	Wildtyp Stamm	
<i>C. jejuni</i> NCTC 81116	Wildtyp Stamm	

2.1.9. *Oligonukleotide***Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide unter Angabe der Sequenz und Quelle**

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3' (Restriktionsschnittstellen kursiv; eingeführte Punktmutationen in fett)	T <sub>m</sub> [C°]	Quelle
tsdAs_f	CCA CAA AGA AAC ATA TGC GCG GTG ( <i>Nde</i> I)	61,8	Denkmann et al. 2012
tsdAs_rev	CCG ACG GGT GAT ATC GCG TCG ( <i>Eco</i> RV)	66,6	Denkmann et al. 2012
TsdA_Xbalf	CGG TTT CCC TCT AGA AAT AAT ( <i>Xba</i> I)	52,6	Denkmann et al. 2012
IBA1_hindrev	GCC GGA TCA AGC TTA TTA ( <i>Hind</i> III)	52,8	Denkmann et al. 2012

### Fortsetzung Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide unter Angabe der Sequenz und Quelle

CysGlyfw	GGC GAT <b>GGT</b> TTC GAG	54,3	Denkmann et al. 2012
CysGly_rev	CTC GAA <b>ACC</b> ATC GCC	54,3	Denkmann et al. 2012
CysHisfw	ATC GGC GAT <b>CAT</b> TTC GAG	55,6	Diplomarbeit (2011)
CysHis_rev	CTC GAA <b>ATG</b> ATC GCC GAT	55,6	Diplomarbeit (2011)
CysMetfw	ATC GGC GAT <b>ATG</b> TTC GAG CGC	61,8	diese Arbeit
CysMet_rev	GCG CTC GAA <b>CAT</b> ATC GCC GAT	61,8	diese Arbeit
LysGlyfw	ATC AAG CAC <b>GGG</b> ATG CCG TTA	62,2	diese Arbeit
LysGly_rev	TAA CGG CAT <b>CCC</b> GTG CTT GAT	62,2	diese Arbeit
LysAsnfw	ATC AAG CAC <b>AAC</b> ATG CCG TTA	50,5	diese Arbeit
LysAsn_rev	TAA CGG CAT <b>GTT</b> GTG CTT GAT	50,5	diese Arbeit
MetGlyfw	AAG CAC AAG <b>GGG</b> CCG TTA G	53	diese Arbeit
MetGly_rev	CTAAC GGC <b>CCC</b> TTG TGC TT	53	diese Arbeit
TsdA_Xbaloptf	ACG CAG GAT <i>CTA</i> GAT CCC GCG ( <i>XbaI</i> )	63,7	diese Arbeit
IBA1_hindoptrev	GCC GGA TCA <i>AGC TTA</i> TTA TTT TTC GAA CT ( <i>HindIII</i> )	62,4	diese Arbeit
Camje_fw	GGAGGAAAACATATGAATAAATTTTC ( <i>NdeI</i> )	50,1	Liu et al. 2013
Camje_rev	AATTGCCTTAGATATCTTTTTTATC ( <i>EcoRV</i> )	50,1	Liu et al. 2013
Cj040_fw	AGGAAACATATGAAAAACACATTTTATTGCTTGG ( <i>NdeI</i> )	57,4	Liu et al. 2013
Cj040_rev	CAAATGATATCTTCTCCTGGGGAAGTG ( <i>EcoRV</i> )	58,5	Liu et al. 2013

#### 2.1.10. Plasmide

**Tabelle 10: Verwendete Plasmide mit Beschreibung unter Angabe der Quelle**

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pEC86	Cm <sup>r</sup> , Produkt aus pEC66 und pACYC184 mit den <i>E.coli</i> ccmABCDEFGH Genen	Arslan et al. 1998
pET22b+	Ap <sup>r</sup> , His-tag, T7lac promotor	Merck KGaA (Darmstadt)
pASK-IBA3+	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, Tet promotor	IBA (Göttingen)
pPR-IBApelB	Ap <sup>r</sup> , IBA 1 Vektor mit pelB-Leader, Strep-tag, f1 origin	IBA (Göttingen)
pPR-IBApelBdsrJ	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, NcoI-Eco47III Fragment von PCR amplifiziertem dsrJ in pPR-IBApelB	Grein et al. 2010
pPR-IBAstrepdsrJ	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, Eco31I Fragment von PCR amplifiziertem dsrJ in verdauten pPR-IBA1	zur Verfügung gestellt von Dr. Fabian Grein
pETstrepdsrJ	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, NcoI-HindIII Fragment aus pPR-IBAstrepdsrJ in verdauten pET-22b	zur Verfügung gestellt von Dr. Fabian Grein

**Fortsetzung Tabelle 10: Verwendete Plasmide mit Beschreibung unter Angabe der Quelle**

pPR-IBAtsdAsstrep	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, f1 origin, T7lac Promotor, <i>NdeI</i> - <i>EcoRV</i> Fragment von PCR amplifiziertem <i>tsdAs</i> in verdauten pPR-IBApelBdsrJ	Denkmann et al. 2012
pPR-IBAtsdAsCys96Glystrep	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, Cys96Gly Mutation in pPR-IBAtsdAsstrep eingebracht	Denkmann et al. 2012
pPR-IBAtsdAsCys96Hisstrep	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, Cys96His Mutation in pPR-IBAtsdAsstrep eingebracht	Diplomarbeit
pPR-IBAtsdAsCys96Metstrep	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, Cys96Met Mutation in pPR-IBAtsdAsstrep eingebracht	diese Arbeit
pPR-IBAtsdAsLys208Glystrep	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, Lys208Gly Mutation in pPR-IBAtsdAsstrep eingebracht	diese Arbeit
pPR-IBAtsdAsLys208Asnstrep	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, Lys208Asn Mutation in pPR-IBAtsdAsstrep eingebracht	diese Arbeit
pPR-IBAtsdAsMet209Glystrep	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, Met209Gly Mutation in pPR-IBAtsdAsstrep eingebracht	diese Arbeit
pET- <i>alvin2274</i>	Ap <sup>r</sup> , His-tag, <i>NdeI</i> - <i>NcoI</i> Fragment von PCR amplifiziertem <i>alvin_2274</i> in verdauten pET-22b(+) eingebracht	(Franke 2013)
pASK- <i>alvin2274</i> -C-strep	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, <i>XbaI</i> - <i>NcoI</i> Fragment von pET-Alvin2274 in verdauten pASK-IBA3+ eingebracht	(Franke 2013)
pET- <i>marpuDRAFT_1194</i>	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, <i>NdeI</i> - <i>XhoI</i> Fragment von PCR amplifiziertem <i>marpuDRAFT_1194</i> in verdauten pET- <i>alvin_2601</i> (pET-22b(+) Vektor + <i>alvin_2601</i> Gen) eingebracht	(Reuter 2013)
pASK-IBATint- <i>tsdB</i>	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, Tet ,Promotor, <i>BsaI</i> Fragment von PCR amplifiziertem <i>tsdB</i> in verdauten pASK-IBA3+ eingebracht	Denkmann et al. 2012
pEtsdA	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, <i>NdeI</i> - <i>EcoRV</i> Fragment von PCR amplifiziertem <i>c8J_0815</i> in verdauten pPR-IBApelBdsrJ eingebracht	Liu et al. 2013
pEcj40	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, <i>NdeI</i> - <i>EcoRV</i> Fragment von PCR amplifiziertem <i>c8J_0040</i> in verdauten pPR-IBApelBdsrJ eingebracht	Liu et al. 2013
pASK-IBA3+_ <i>alvin_2879</i>	Ap <sup>r</sup> , Strep-tag, Tet Promotor, <i>BsaI</i> Fragment von PCR amplifiziertem <i>Alvin2879</i> in verdauten pASK-IBA3+ eingebracht	(Koch 2012)
pGEM3Zf(-)	Ap <sup>r</sup> , T7lac Promotor, SP6 Promotor	Promega GmbH (Mannheim)
pMtsdA	Kan <sup>r</sup> , PCR amplifiziertes <i>c8j_0815</i> in das eine Kanamycin-resistenzkassette inseriert, ist eingebracht in <i>HincII</i> verdauten PGEM3Zg(-)	Liu et al. 2013
pM0040	Kan <sup>r</sup> , PCR amplifiziertes <i>c8j_0040</i> in welches eine Kanamycinresistenzkassette inseriert ist, eingebracht in <i>HincII</i> verdauten PGEM3Zg(-)	Liu et al. 2013
pC46	Cm <sup>r</sup> , <i>C. jejuni cj0046</i> Pseudogen - Integrationsvektor	Gaskin et al. 2007
pCtsdA	Cm <sup>r</sup> , <i>tsdA</i> Komplementationsvektor, <i>Eps3I</i> Fragment von PCR amplifiziertem <i>cjtsdA</i> in verdauten PC46 eingebracht	Liu et al. 2013

## 2.2. Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit rekombinanten Proteinen gearbeitet, welche heterolog in *Escherichia coli* über-produziert wurden. Zur Anzucht von Vorkulturen und bei der Produktion des „High-potential-iron-sulfur proteins“ (HiPIP) aus *A. vinosum* sowie TsdB aus *Thiomonas intermedia* wurde LB-Medium verwendet. Vorkulturen für die heterologe Proteinproduktion oder für die Erstellung chemisch kompetenter *E. coli* enthielten fünf mL LB-Medium, und wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm im Inkubator (Tabelle 6) geschüttelt.

#### Luria Bertani (LB) Medium (Maniatis et al. 1982)

Material:

- 10 g Pepton tryptisch verdaut
- 5 g Natriumchlorid
- 5 g Hefeextrakt

Ad. 1000 mL mit Wasser demin.

Der pH-Wert wurde mittels 1M Salzsäure auf pH 7,5 eingestellt. Für die Herstellung von Agarplatten wurden 15 Gramm Agar pro Liter Medium hinzugefügt. Anschließend wurde das Medium für 15 Minuten, bei 121 °C autoklaviert und verwendet. Zur Herstellung von Selektivagarplatten wurde dem Medium nach Abkühlen auf 60 °C Antibiotikastammlösung im Verhältnis 1 zu 1000 zugegeben. Bei der Produktion von TsdA aus *A. vinosum* sowie aller AvTsdA-Varianten wurde zur Anzucht von *E. coli* NZCYM Medium verwendet (siehe auch Abschnitt 2.4).

#### NZCYM Medium (Blattner et al. 1977)

- Material:
- 10 g N-Z-Amine A aus Rindermilch (Casein enzymatisches Hydrolysat)
  - 5 g Natriumchlorid
  - 5 g Hefeextrakt
  - 2 g Magnesiumheptahydrat
  - 2 g Maltose
  - 1 g Protein Hydrolysat Amikase (Casaminosäuren)

Ad. 1000 mL mit Wasser demin.

Der pH-Wert wurde mittels 1M Salzsäure auf pH 7,5 eingestellt. Anschließend wurde das Medium für 15 Minuten, bei 121 °C autoklaviert und verwendet.

### 2.2.2. Präparation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

(Dagert und Ehrlich 1979) (Mandel und Higa 1970)

Resuspensionslösung: 70 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>

Um chemisch kompetente *E. coli*-Zellen zu erhalten wurden zunächst Vorkulturen des benötigten Bakterienstammes angelegt (2.2.1). 700 µL einer Vorkultur wurden in eine 70 mL umfassende Hauptkultur überführt, die bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0.5 bei 37 °C und 180 rpm in einem Inkubator (Tabelle 6) angezogen wurde. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (2.800 g, 6 Minuten, 4 °C; Tabelle 6) und in 10 mL der Resuspensionslösung gelöst. Nach einer 45 minütigen Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert (2.800 g, 10 Minuten, 4 °C; Tabelle 6) und das Pellet in 3,5 mL der Resuspensionslösung gelöst. Abschließend wurde die Suspension 30 Minuten auf Eis inkubiert und 875 µL eisgekühltes Glycerin hinzugegeben. Die nun chemisch, kompetenten *E. coli*-Zellen wurden in 300 µL aliquotiert und die Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

## 2.3. Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis et al. 1992)

Zur Amplifikation von *tsdA*- und *tsdB*-Genen wurden Standard PCR Protokolle verwendet (siehe unten). Zur Klonierung in Plasmide für die Transformation in chemisch kompetente *E. coli* DH5α (2.1.8) wurde die Pfu-Polymerase (Tabelle 3) eingesetzt. Genomische DNA von *A. vinosum* diente als Ausgangsmaterial zur Amplifikation von *AvtsdA* (Alvin0091), *alvin2879* und *alvin2274* (Tabelle 4), genomische DNA von *C. jejuni* (Tabelle 4) als Ausgangsmaterial zur Amplifikation von *cjtsdA* (*c8j0815*) und *c8j0040*. Als Basis zur Erstellung von TsdA-Varianten diente das Plasmid IBAtsdAs (Tabelle 10).

Standard PCR-Protokoll:

95 °C → 3 min

95 °C → 1 min

$T_m$  Primer. → 30 s

72 ° → \*

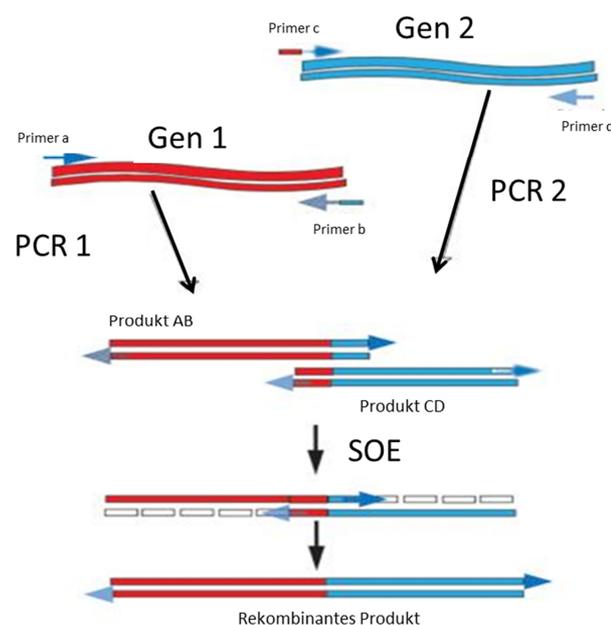
72 °C → 5 min

4 °C → ∞

\* = abhängig von der Anzahl der Nukleotide ( 2 min/1000 Bp) ; $T_m$  P. = siehe dazu 2.1.9

### 2.3.2. GENE SOEING (*gene splicing by overlap extensions*) (Horton et al. 1995)

Die Methode des Gene SOEING wurde verwendet um Punktmutationen in die Nukleotidsequenz von dem Protein *AvtsdA* einzuführen. Dazu wurden zwei Standard-PCRs (2.3) zur Amplifikation von überlappenden Genbereichen von *tsdA* mit Hilfe von Oligonukleotiden (2.1.9), die die gewünschte Mutation trugen, durchgeführt. Die erhaltenen Produkte dienen als Ausgangsmaterial einer dritten PCR, in welcher das komplette Gen mit der nun enthaltenen Mutation amplifiziert wurde (Abbildung 9). Auf diese Weise konnten Plasmide mit verschiedenen Varianten des *tsdA*-Gens erhalten werden (Tabelle 10), die für TsdAs mit mutiertem Cystein<sub>96</sub> oder Lysin<sub>208</sub> kodieren: TsdAC<sub>96</sub>G, TsdAC<sub>96</sub>M, TsdAC<sub>96</sub>H, TsdAK<sub>208</sub>G und TsdAK<sub>208</sub>N.



**Abbildung 9:** Gene SOEING nach Horton 1995 (<http://www.biotechniques.com/>).

### 2.3.3. Visualisierung von DNA

50 x TAE: 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 10 mM EDTA (2.1.1)

10 x Ladepuffer: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 40 % (w/v) Saccharose (2.1.1)

Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde mit entsprechenden Mengen 10 x Ladepuffer gemischt und in Taschen eines 1 %-igen Agarosegels gegeben. Als Standard wurde ein 1 kB- oder 100 bp GeneRuler DNA Ladder mit aufgetragen (Tabelle 4). Eine Spannung von 95 V wurde an die Agarosegelelektrophorese Kammer (Tabelle 6) angelegt und die DNA durch die Poren des Agarosegels ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die DNA wurde mit GelRed<sup>Tm</sup> (2.1.1) zehn Minuten lang im Dunkeln angefärbt und unter Zuhilfenahme der Geldokumentationsanlage (Tabelle 6) visualisiert.

### 2.3.4. Aufreinigung von DNA aus dem Agarosegel

Das benötigte Fragment wurde aus dem Gel mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten und die DNA wurde entsprechend den Anweisungen aus dem Protokoll des GeneJET<sup>Tm</sup> Gel Extraction Kit (Tabelle 7) aufgereinigt.

### 2.3.5. Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme wurden von Thermo Scientific bezogen (Tabelle 3) und nach Angaben des Herstellers im entsprechenden Puffer eingesetzt. Standardmäßig wurden dazu 1 – 2 µL Restriktionsenzym in einem 30 – 50 µL Ansatz für ein bis drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei Restriktionsenzymen mit Sternaktivität wurde ein verkürzter Verdau mit anschließender Inaktivierung des Enzyms durchgeführt.

### 2.3.6. Alkalische Dephosphorylierung

Um die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Ligation von verdauten DNA-Fragmenten mit einem geschnittenen Plasmid zu erhöhen wurde im Vorfeld eine alkalische Dephosphorylierung des Vektors durchgeführt. Dazu wurde alkalische Phosphatase nach Angaben des Herstellers (Tabelle 3) zur Vektor-DNA gegeben und für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine fünf-minütige Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 75 °C.

### 2.3.7. DNA Ligation

Um DNA-Fragmente (z. B. PCR-Produkte) in einen Vektor zu klonieren, wurde das entsprechende Fragment im Verhältnis drei zu eins und/oder fünf zu eins zu dem Vektor eingesetzt. Die Ligation erfolgte durch die Zugabe von T4-DNA Ligase (Tabelle 3) in

dem korrespondierenden Puffer. Ligationsansätze umfassten ein Volumen von 10  $\mu\text{L}$  und wurden, entweder bei Raumtemperatur für zwei bis drei Stunden oder bei 4 °C über Nacht inkubiert.

#### 2.3.8. DNA Präparation

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurden 5 mL *E. coli* DH5 $\alpha$  Kulturen, die das gewünschte Plasmid trugen, angelegt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei Plasmiden mit Resistenzgenen wurden 5  $\mu\text{L}$  der entsprechenden Antibiotika Stammlösung (Tabelle 2) hinzugegeben. Die Präparation erfolgte mit Hilfe des GeneJET™ Plasmid Preparation Kit (0) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die erhaltene DNA wurde in 30  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O<sub>r</sub> aufgenommen.

#### 2.3.9. DNA Sequenzierung

Mutationen welche mittels GENE SOEING (2.3.2) in ein Gen eingebracht wurden, konnten über eine Sequenzierung des entsprechenden DNA Abschnittes überprüft werden. Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (Konstanz, Deutschland) durchgeführt.

#### 2.3.10. Transformation chemisch kompetenter *E. coli* (Hanahan 1983)

- 2 x YT-Medium:
  - 5 g NaCl,
  - 16 g Pepton tryptisch verdaut
  - 10 g Hefeextrakt
  - Ad. 1000 mL Wasser demin.

Den pH-Wert auf 7,0 mit 1M Salzsäure einstellen und für 15 min bei 121 °C autoklavieren (2.1.1).

Chemisch kompetente *E. coli* (2.2.2) wurden mit 1  $\mu\text{l}$  eines Plasmides (Tabelle 10) oder 10  $\mu\text{l}$  eines Ligationsansatzes (2.3.7) zusammen gegeben und für 45 – 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgten ein 90 Sekunden langer Hitzeschock bei 42 °C und eine zweiminütige Lagerung auf Eis. Es wurden 500  $\mu\text{l}$  LB-Medium oder 2xYT-Medium (2.2.1) hinzugegeben und der Transformationsansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Platten (2.2.1) mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und im 37 °C Brutschrank über Nacht bebrütet. Transformanden konnten am nächsten Tag über die Bildung von Kolonien nachgewiesen werden.

## 2.4. Heterologe Produktion von Proteinen in *E. coli*

### 2.4.1. Heterologe Produktion von AvTsdA und AvTsdA-Varianten in *E. coli*

(Denkman et al. 2012)

Für die heterologe Produktion von AvTsdA und allen AvTsdA-Varianten in *E. coli* wurden zunächst Vorkulturen (2.2.1) mit einem das entsprechende Plasmid (Tabelle 10) tragenden *E. coli* BL21 (2.1.8) angelegt. 700 mL Hauptkulturen wurden dann je 0,5 %ig mit einer Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 37 °C und 180 rpm im Inkubator bebrütet. Die Induktion der Protein Produktion erfolgte durch einen Temperaturwechsel zu 25 °C über Nacht. Bei der Produktion von *c*-Typ Cytochromen, wie der Thio-sulfat Dehydrogenase (1.1), wurde zusätzlich zum Expressionsplasmid der pEC86-Vektor (Tabelle 10) in den Bakterienstamm eingebracht (2.3.10). Dieser Vektor kodiert für die *ccm* (*c*-type cytochrome maturation) Gene und ermöglicht den Einbau von Häm als Cofaktor in Proteine in *E. coli* (Arslan et al. 1998).

### 2.4.2. Heterologe Produktion von TintTsdB in *E. coli*

Zur heterologen Produktion von TintTsdB in *E. coli* wurden Vorkulturen (2.2.1) mit *E. coli* BL21 (2.1.8) angelegt die den pEC86-Vektor und pASK-IBATint\_tsdB tragen (Tabelle 10). 400 mL Hauptkulturen wurden dann 0,5 %ig mit den Vorkulturen angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,9 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde mit 50 µM Anhydrotetrazyklin induziert und die Inkubation bei 25 °C über Nacht fortgesetzt.

### 2.4.3. Heterologe Produktion von Alvin\_2879 in *E. coli*

Für die heterologe Produktion von Alvin\_2879 wurden Vorkulturen (2.2.1) mit *E. coli* BL21 pEC86-Vektor, pASK-IBA3+\_alvin\_2879 (Tabelle 10) angelegt. 700 mL Hauptkulturen wurden dann 0,5 %ig mit den Vorkulturen angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Es erfolgte die Induktion mit 25 µM Anhydrotetrazyklin und anschließend wurden die Kulturen bei 30 °C und 90 rpm über Nacht inkubiert.

### 2.4.4. Heterologe Produktion von HiPIP (Alvin\_2274) in *E. coli*

Zur heterologen Produktion von HiPIP in *E. coli* wurden Vorkulturen (2.2.1) mit *E. coli* BL21 pEC86-Vektor, pASK-alvin2274-C-strep (Tabelle 10) angelegt. 700 mL Hauptkulturen wurden 0,5 %ig aus den Vorkulturen angeimpft und dann bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,7 inkubiert. Anschließend wurde die Produktion von HiPIP mit 100 µM IPTG induziert. Zeitgleich wurden 1 mM FeSO<sub>4</sub> und 1 mM L-Cystein hinzu

gegeben, damit eine ausreichende Synthese von Eisenschwefelclustern in *E. coli* für den Einbau in HiPIP gewährleistet war.

#### 2.4.5. *Heterologe Produktion von CjTsdA (C8J\_0815) in E. coli*

Die heterologe Produktion von CjTsdA in *E. coli* erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie die heterologe Produktion von AvTsdA in *E. coli* (2.4.1).

#### 2.4.6. *Zellaufschluss*

Die Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (12.100 g, 25 min, 4 °C) pelletiert. Zellpellets wurden dann in einem angemessenen Volumen (2 mL/g Pellet) Tris-HCl Puffer pH 8,0 oder BisTris-HCl Puffer pH 6.5 resuspendiert und via Ultraschall (2 min/mL) aufgeschlossen (Tabelle 6). Durch eine erneute Zentrifugation (27.200 g, 30 min, 4 °C) wurden Zelltrümmer abgetrennt.

## 2.5. Proteinbiochemische Methoden

### 2.5.1. *Strep-Tag Affinitätschromatographie*

Das Protein bindet bei der Strep-Tag Affinitätschromatographie über einen angehängten Strep-Tag an eine Streptactin Säulenmatrix (2.1.1) und kann anschließend über die Zugabe von D-Desthiobiotin eluiert (2.1.1) werden. Die Durchführung der Affinitätschromatographie erfolgte nach den Angaben im Protokoll des Herstellers (IBA, Göttingen). Abhängig vom Volumen des aufzureinigenden Materials wurden dabei entweder 2 mL Streptactinsäulen oder 5 mL HiTrap Strep-Tag Säulen (GE-Healthcare, München) verwendet.

### 2.5.2. *Entsalzung von Proteinen*

Um überschüssiges Salz oder D-Desthiobiotin zu entfernen wurden eluierte Proteinfractionen mittels HiTrap Entsalzungssäulen aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben im Protokoll des Herstellers (GE-Healthcare, München). Das Eluat wurde entweder in einen 20 mM Tris-HCl Puffer pH 8,0 oder 20 mM BisTris-HCl Puffer pH 6,5 aufgenommen.

### 2.5.3. *Konzentration von Proteinen*

Zur Konzentration von Proteinen wurden abhängig vom Volumen entweder Amicon Ultra Zentrifugal Units (Merck KGaA, Darmstadt) oder Vivaspin 500 (Satorius, Göttingen) verwendet. Die Zentrifugation erfolgte nach den Angaben im Protokoll des Herstellers.

#### 2.5.4. SDS-PAGE (Laemmli 1970)

Lösung A: 1,5 M Tris, 0,3 % (w/v) SDS; pH 8,8

Lösung B: 0,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS; pH 6,8

5 x Elektrophorese Puffer: 15 g Tris, 72 g Glycin, 5 g SDS; Ad 1000 mL H<sub>2</sub>O<sub>r</sub>

Ladepuffer, nicht reduzierend: 125 mM Tris, 10 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8 (2.1.1)

Die SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-polyacrylamid gelelectrophorese) ist eine Methode um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Zur Beschwerung der Proteine, werden diese mit einem Ladepuffer versetzt. Bei Häm-haltigen Proteinen wurde nicht reduzierender Ladepuffer verwendet, um eine anschließende Häm Färbung zu ermöglichen. In einem Sammelgel (H<sub>2</sub>O, Lösung B, Polyacrylamid, APS und TEMED) bilden die Proteine zunächst eine einheitliche Lauffront um dann im Trenngel (H<sub>2</sub>O, Lösung A, Polyacrylamid, APS und TEMED) ihrer Größe entsprechend aufgetrennt zu werden. Das SDS verleiht den Proteinen eine negative Ladung proportional zu ihrem Molekulargewicht und die Auftrennung erfolgt über die Anlegung einer Spannung von 80 – 120 mV. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden Proteine wurden SDS-Gele mit 10, 12 oder 15 % Polyacrylamid verwendet.

#### 2.5.5. Häm Färbung (Thomas et al. 1976)

Färbelösungen: 4,5 mg TMBZ in 15 mL Methanol

0,72 g Natriumacetat in 35 mL Wasser (pH 5,0)

Die Häm Färbung färbt Proteine, welche c-Typ Häme als Cofaktor enthalten, spezifisch auf dem SDS-Gel an. Das SDS-Gel wurde dazu 30 min mit den Färbelösungen im Dunkeln inkubiert und danach 600 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzu gegeben. Die Peroxidaseaktivität wurde durch Abgießen der Lösungen und die Zugabe von Wasser gestoppt. Häm haltige Proteine erschienen hellblau im SDS-Gel.

#### 2.5.6. Coomassiefärbung

Färbelösung: 0,25 % (w/v) Coomassie Blue R250, 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig

Entfärberlösung: 20 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig

Das SDS-Gel wurde eine Stunde in der Färbelösung inkubiert und anschließend über Nacht in Entfärberlösung entfärbt. Coomassie Blue R250 färbt Proteine durch Anlage-

rung an deren basische Seitenketten unspezifisch an (Nachweisgrenze 0,5 µg). Die Coomassiefärbung konnte im Anschluss an die Häm Färbung erfolgen.

## 2.6. Protein analytische Methoden

### 2.6.1. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test (Lowry et al. 1951)

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde mit Hilfe des BCA-Tests bestimmt. Dazu wurde die Proteinlösung/en in verschiedenen Verdünnungsstufen gegen eine BSA-Kalibrierkurve (0 – 500 µg/mL BSA in Dreifachbestimmung) im BCA-Test eingesetzt. Der Test wurde nach Angaben im Protokoll des Herstellers des Pierce BCA Assay Kit (Tabelle 7) durchgeführt und im Plattenlesegerät (Tabelle 6) ausgewertet. Anschließend konnte anhand der BSA-Kalibrierkurve die Proteinkonzentration errechnet werden.

## 2.7. Chromatographische Methoden

### 2.7.1. Gelfiltration über FPLC (fast protein liquid chromatography)

Durch die Gelfiltration können Proteine nach ihrer Größe hin aufgetrennt werden. Die Proteine wandern dabei durch eine aus Agarose und Dextran bestehende Säulenmatrix, wobei kleinere Proteine in den Poren der Matrix hängen bleiben und langsamer als größere Proteine durch die Säule laufen. Es wurde eine 120 mL ( $V_t$ ) Superdex75 Säule (GE Healthcare, München) angeschlossen an ein Äkta Purifier System (Tabelle 6) verwendet. Üblicherweise wurden entgaste (1 Std/L Vakuum) Puffer, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 oder 50 mM BisTris-HCl pH 6,5 mit 150 mM NaCl versetzt, verwendet. Ein Standard FPLC-Lauf hatte eine Fließgeschwindigkeit von 0,5 mL/min, 1 mL Fraktionen und ein Probenvolumen von 500 µl – 2 mL. Während der Gelfiltration stellte die Software Unicorn (Tabelle 5) den Druck und die Absorption bei 280 nm dar. Mit Hilfe des  $K_{AV}$  ( $K_{AV} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ ) und der Kalibriergerade der Säule konnte auf das Molekulargewicht der aufgetragenen Proteine geschlossen werden. Die Abkürzungen  $V_e$ ,  $V_0$  und  $V_t$  beziehen sich auf das Elutionsvolumen, Leervolumen und Totalvolumen der angeschlossenen Säule.

## 2.8. Spektroskopische Methoden

### 2.8.1. Bestimmung von Thiosulfat und Tetrathionat

Die Thiosulfat Konzentration in den Kulturüberständen von *C. jejuni* wurde nach der Methode von Urban 1961 bestimmt. Tetrathionat wurde über Cyanolyse nach Kelly et al. 1969 determiniert. Beide Methoden basieren auf der Konvertierung zu Thiocyanat und der Bestimmung des roten Eisenkomplexes nach Addition von Eisen-Nitrat-Reagenz über die Messung der Absorption bei 460 nm gegen eine Standardreferenzkurve.

### 2.8.2. UV-Vis Spektroskopie – Aufnahme von Proteinspektren

Im UV-Vis Spektrum von *c*-Typ Cytochromen ist im oxidierten Zustand im 400 nm Bereich der Soret-Peak und bei ~520 nm ein  $\alpha/\beta$ -Peak zu erkennen. Im reduzierten Zustand sind im UV-Vis Spektrum drei charakteristische Peaks zu erkennen, der Soret- ( $\gamma$ ), der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Peak. (Lemberg und Barrett 1973). Alle Proteinspektren wurden mit einem Specord210 (Tabelle 6) aufgenommen und anschließend in Microsoft Excel bearbeitet und dargestellt (Tabelle 5). Um alle Absorptionsmaxima hochauflösend darstellen zu können wurden als Standard Parameter die Wellenlängen 250 nm – 750 nm in 0,2 nm Schritten aufgenommen. Als Referenz diente entweder Wasser oder der Lagerungspuffer des Proteins.

### 2.8.3. UV-Vis Spektroskopie – Thiosulfat-abhängige Reduktion von Ferricyanid

Thiosulfatdehydrogenasen (TsdA) oxidieren zwei Moleküle Thiosulfat zu einem Molekül Tetrathionat unter der Freisetzung von zwei Elektronen (Denkman et al. 2012). Im Enzymaktivitätstest wurde Ferricyanid (1 mM Kaliumhexocyanoferrat (III)) als artifizieller Elektronenakzeptor ( $\epsilon_{420\text{nm}} = 1,09 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ; (Friedrich et al. 1989) ) eingesetzt. In einem 300  $\mu\text{l}$  Ansatz wurden  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ , ein geeigneter Puffer, Ferricyanid und Thiosulfat zusammengegeben und anschließend die enzymatische Reaktion durch die Zugabe einer TsdA gestartet. Über die Abnahme der Absorption bei 420 nm konnte eine negative Steigung und damit die spezifische Aktivität für die Thiosulfat-abhängige Reduktion von Ferricyanid errechnet werden. Die Durchführung der Enzymaktivitätstests erfolgte im Specord210 (Tabelle 6) mit 500  $\mu\text{l}$  Präzisionsküvetten (Hellma Analytics, Mühlheim).

### 2.8.4. UV-Vis Spektroskopie – Thiosulfat-abhängige Reduktion von Pferdeherz Cytochrom *c*

Pferdeherz Cytochrom *c* ist ein Monohäm Cytochrom mit einem Molekulargewicht von 12 kDa, welches als Elektronenakzeptor eingesetzt werden kann ( $\epsilon_{550\text{nm}} = 21,1 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

<sup>1</sup>; (van Gelder und Slater 1962)). Im Enzymaktivitätstest wurden 80  $\mu\text{M}$  Pferdeherz Cytochrom *c* (Tabelle 3) mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ , Puffer und Thiosulfat in einer 500  $\mu\text{l}$  Küvette (Hellma Analytics, Mühlheim) eingesetzt. Der Test wurde durch die Zugabe einer TsdA gestartet und die Zunahme der Absorption bei 550 nm ( $\alpha$ -Peak von Pferdeherz Cytochrom *c*) über Winlab (Tabelle 5) verfolgt. Anhand dieser konnte eine Steigung und somit die spezifische Aktivität des zugegebenen Enzyms errechnet werden. Die Durchführung der Enzymaktivitätstests erfolgte am Specord210 (Tabelle 6).

#### 2.8.5. UV-Vis Spektroskopie – Thiosulfat-abhängige Reduktion von HiPIP (Alvin\_2274)

HiPIP ist ein Ferredoxin-ähnliches Protein mit einem Redoxpotential von + 360 mV, welches in *A. vinosum* in hohen Konzentrationen vorkommt. (Verméglio et al. 2002) HiPIP hat ein Molekulargewicht von 10 kDa und hat ein [4Fe-4S]-Cluster als Cofaktor gebunden (Brüser et al. 1997). Bereits in früheren Arbeiten wurde HiPIP als Elektronenakzeptor für AvTsdA eingesetzt ( $\epsilon_{480\text{nm}} = 4,81 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ; (Franke 2013; Sperling 2001)). Im Enzymaktivitätstest wurden 40  $\mu\text{M}$  mit Ferricyanid oxidiertes HiPIP zusammen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ , einem geeigneten Puffer und Thiosulfat eingesetzt. Durch die Zugabe einer TsdA wurde der Test gestartet und die Abnahme der Absorption bei 480 nm verfolgt. Aus dieser wurde über eine negative Steigung die spezifische Aktivität für das getestete Enzym errechnet. Die Durchführung der Enzymaktivitätstests erfolgte am Specord210 (Tabelle 6) mit 500  $\mu\text{l}$  Präzisionsküvetten (Hellma Analytics, Mühlheim).

#### 2.8.6. UV-Vis Spektroskopie – Thiosulfat-abhängige Reduktion von TsdB (Tint\_2893)

TsdB ist ein Dihäm *c*-Typ Cytochrom und der native Elektronenakzeptor von TsdA in *T. intermedia* (Denkman et al. 2012). TsdB hat ein Molekulargewicht von 21,8 kDa und es wurde gezeigt, dass TsdB durch AvTsdA reduzierbar ist ( $\epsilon_{417\text{nm}} = 350 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ; (van Helmont 2012)). 40  $\mu\text{M}$  TsdB wurden im Enzymaktivitätstest zusammen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$ , einem geeigneten Puffer und Thiosulfat in einer 500  $\mu\text{l}$  Präzisionsküvette (Hellma Analytics, Mühlheim) eingesetzt. Durch die Zugabe von TsdA wurde der Test gestartet und die Zunahme der Absorption bei 417 nm (Soret-Peak Absorptionsmaximum von TsdB im reduzierten Zustand) verfolgt. Über die errechnete Steigung der Absorptionzunahme konnte auf die spezifische Aktivität des getesteten Enzyms geschlossen werden. Die Enzymaktivitätstests wurden am Specord210 (Tabelle 6) durchgeführt.

#### 2.8.7. UV-Vis Spektroskopie – Thiosulfat-abhängige Reduktion von Alvin\_2879

Alvin\_2879 ist ein Monohäm *c*-Typ Cytochrom aus *A. vinosum* mit einem Molekulargewicht von 20,7 kDa. Im Enzymaktivitätstest wurden 40  $\mu\text{M}$  Alvin\_2879 zusammen mit

H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub>, einem geeigneten Puffer und Thiosulfat eingesetzt. Nach der Zugabe von AvTsdA konnte aus der Veränderung der Absorption bei 420 nm die spezifische Aktivität berechnet werden. Alle Tests wurden mit Hilfe eines GENESYS 20 Visible Spectrophotometer (Tabelle 6) und 1 mL Präzisionsküvetten (Hellma Analytics, Mühlheim) durchgeführt.

#### 2.8.8. UV-Vis Spektroskopie – Tetrathionat-abhängige Oxidation von reduziertem Methylviologen

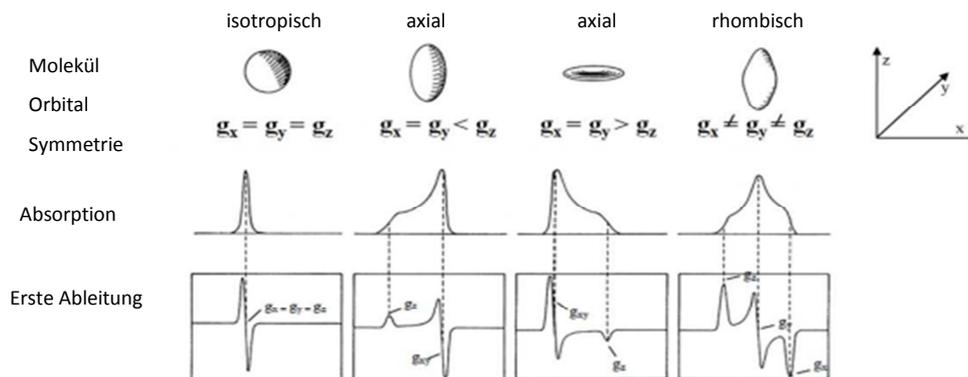
Um die TsdA-katalysierte Reduktion von Tetrathionat zu messen, wurde als Elektronendonator mit Titan (III) citrat (2.9.1) reduziertes Methylviologen ( $\epsilon_{585\text{nm}} = 11,8 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ; persönliche Kommunikation Prof. Dave Kelly) verwendet. Unter anaeroben Bedingungen (2.9) wurden H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> (entgast), 100 mM Acetatpuffer pH 5.0 (N<sub>2</sub> – begast), 600  $\mu\text{M}$  Methylviologen (N<sub>2</sub> – begast) + Titan (III) citrat (N<sub>2</sub> – begast) und TsdA (N<sub>2</sub> – begast) in eine 3 mL Präzisionsküvette (Hellma Analytics, Mühlheim) gegeben. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe von Tetrathionat (N<sub>2</sub> – begast) gestartet und die Abnahme der Absorption bei 585 nm gemessen. Bei der Berechnung der negativen Steigung musste über Kontrollmessungen die chemische Hintergrundreaktion von Tetrathionat mit reduziertem Methylviologen berücksichtigt werden. Auf die Tetrathionat reduzierende spezifische Aktivität der TsdA konnte aus der errechneten negativen Steigung geschlossen werden. Alle Messungen wurden mit einem Agilent 8453 Diodenarray Photometer (Tabelle 6) durchgeführt.

#### 2.8.9. EPR-Spektroskopie

EPR bedeutet „Elektro-paramagnetic-resonance“ und ist eine Technik, die zur Detektion von paramagnetischen Komponenten (Komponenten mit ungepaarten Elektronen) verwendet wird. EPR beruht darauf, dass sich Elektronen je nach ihrem Spin (parallel oder antiparallel) in einem magnetischen Effekt gleich ausrichten (Zeeman Effekt). Ein ungepaartes Elektron kann zwischen zwei Zuständen wechseln und dabei Energie absorbieren oder emittieren. Absorption tritt immer dann auf, wenn der Energieunterschied zu dem magnetischen Feld korrespondiert. Das EPR-Spektrum stellt die Absorption bei der Variation des magnetischen Feldes bei einer konstanten Energie dar. Charakteristisch für die Merkmale einer Probe sind die g-Werte.

Im ungeladenen Status hat das wechselnde Eisenatom die Elektronenkonfiguration 1s<sup>2</sup>2s<sup>2</sup>2p<sup>6</sup>3s<sup>2</sup>3p<sup>6</sup>3d<sup>6</sup>4s<sup>2</sup>. Die Auffüllung der Orbitale erfolgt dabei nach dem Hund'schen Gesetz, nach dem jedes Orbital in einer Unterschale zuerst mit einem Elekt-

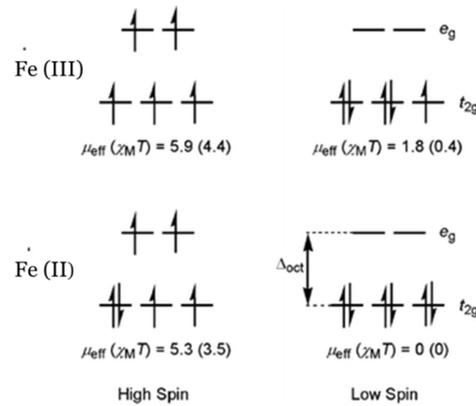
ron belegt werden muss, bevor ein Orbital mit zwei Elektronen belegt wird und alle Elektronen in einzeln belegten Orbitalen haben denselben Spin. Eisen besitzt mehrere einzeln belegte Orbitale und ist somit EPR-aktiv. Mit Hilfe von EPR-Spektroskopie können der Redoxstatus, der Spin und die Ligation des Eisenatoms bestimmt werden. Das dreidimensionale Orbital, in dem sich die ungepaarten Elektronen befinden, bestimmt dabei die Art des EPR-Signals. Die Orbitale hängen von der Struktur des Komplexes ab, die einen direkten Einfluss auf das EPR-Signal hat.



**Abbildung 10:** Ursprung von EPR Spektren. Modifiziert nach Shi et al. 2000.

Häme mit sechsfach koordiniertem Eisen sind oktaedrisch und führen in der Regel zu einem rhombischen EPR-Signal (Abbildung 10) wenn die axialen Liganden nicht senkrecht zueinander stehen. Die axialen Liganden und der Redoxstatus des Eisens beeinflussen die Form des Orbitals und führen im EPR-Spektrum zu charakteristischen g-Werten. Der Spin Status des Häm Eisens kann nur erklärt werden, wenn das Hund'sche Gesetz nur für Orbitale mit dem gleichen Energielevel gilt. Eine Teilung der d-Orbitale in oktaedrischen Komplexen führt zu verschiedenen Energielevel. Zwei wahrscheinliche Möglichkeiten existieren hierfür:

1. Wenn die Energiekosten ein Elektron in einem einzeln belegten Orbital mit niedriger Energie zu platzieren kleiner sind als ein Elektron in einem einzeln belegten Orbital mit hoher Energie zu platzieren, dann handelt es sich um ein „low-spin“ Häm.
2. Wenn die Energiekosten ein Elektron in einem einzeln belegten Orbital mit hoher Energie zu platzieren kleiner sind als ein Elektron in einem einzeln belegten Orbital mit niedriger Energie zu platzieren, dann handelt es sich um ein „high-spin“ Häm.



**Abbildung 11:** Elektronenkonfiguration von Eisen (II) und Eisen (III) in d-Orbitalen mit verschiedenen Energiezuständen in oktaedrischen Systemen nach Halcrow 2008.

In Abbildung 11 sind die Elektronenkonfigurationen von „low-spin“ und „high-spin“ Hämen dargestellt und daraus geht hervor, dass low-spin Häme diamagnetisch sind, also nicht im EPR sichtbar.

Elektronen-paramagnetische-Resonanz (EPR)-Spektroskopie wurde in Kooperation mit Inês A. C. Pereira und Sofia S. Venceslau vom Laboratory for Bacterial Energy Metabolism des Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), Universidade Nova de Lisboa, während eines Forschungsaufenthaltes in Portugal, durchgeführt. Spektren wurden mit einem Bruker EMX Spektrometer ausgestattet mit ESR 900 continuous-flow helium cryostat von Oxford Instruments aufgenommen.

#### 2.8.10. Redoxpotential-Bestimmung mit einer Goldelektrode

Um das Redoxpotential von AvTsdA und TsdB zu bestimmen wurde eine potentiometrische Bestimmung der Potentiale durchgeführt. In anaerobem Milieu (2.9) wurde ein Potentiometer an eine Gold- und Platinelektrode angeschlossen, welche in eine 1 mL Präzisionsküvette (Hellma Analytics) mit der Proteinlösung ragten. Gegen eine Standard-Wasserstoffelektrode wurde nun ein bestimmtes Potential angelegt und mittels eines Photometers und UV-Probe (Tabelle 5) alle 2 min ein Spektrum aufgezeichnet. Über die isobestischen Punkte im Spektrum konnte die Fläche des  $\alpha$ -Peaks errechnet und einem bestimmten Potential zugeordnet werden. Die Fläche des  $\alpha$ -Peaks im komplett oxidierten Spektrum wurde auf 0 und im komplett reduzierten Spektrum auf 1 gesetzt, sodass allen teil-reduzierten Zuständen des Proteins Flächen zwischen 0 und 1 zugeordnet wurden. Unter Anwendung der Nernst-Gleichung,

$$E = E_0 + 0,059V/z_e * \lg C_{\text{ox}}/C_{\text{red}}$$

$E$  = Reduktionspotential,  $E_0$  = Standard Reduktion Potential,  $z_e$  = Anzahl der übertragenen Elektronen,  $C_{\text{ox}}$  = Konzentration von oxidiertem Cytochrom,  $C_{\text{red}}$  = Konzentration von reduziertem Cytochrom.

konnte das Potential der Häme des Proteins errechnet werden. In Tabelle 11 sind die Redoxmediatoren aufgelistet, welche zusammen mit dem Protein in die Küvette gegeben wurden und die Übertragung von Elektronen auf das Protein beschleunigen sollen. Der Versuchsansatz bestand aus 10  $\mu\text{M}$  Protein, 2  $\mu\text{M}$  jedes Mediators und einem geeigneten Puffer (Phosphatpuffer pH 5,0 oder pH 8,0).

**Tabelle 11: Redoxmediatoren**

Mediator	Lösungsmittel	$E_0$ [mV]
N, N dimethyl-1,4 phenylendiamin	Ethanol	340
p-benzochinon	$\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$	300
Trimethylhydrochinon	Ethanol	115
Phenazyn	$\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$	-125
1,4-naphtochinon	Aceton	60
1,2-naphtochinon	Aceton	180

Die Bestimmung des Redoxpotentials mittels einer Goldelektrode wurde im Rahmen einer Kooperation während eines Forschungsaufenthaltes im ITQB im Labor von Prof. Dr. Ricardo O. Louro durchgeführt.

#### 2.8.11. Redoxpotential-Bestimmung mit Natriumdithionit

Zur Bestimmung des Redoxpotentials von AvTsdA wurde Natriumdithionit in Lösung verwendet. Im anaeroben Milieu wurden 10  $\mu\text{M}$  Protein mit 2  $\mu\text{M}$  jedes Redoxmediators (Tabelle 11) in einem geeigneten Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,0) in eine 3 mL Küvette gegeben. Aus einer 50 mM Stammlösung Natriumdithionit wurden geeignete Verdünnungen erstellt und durch die Zugabe zur Proteinlösung das Potential dieser variiert. Alle Potentiale wurden gegen die Standard-Wasserstoffelektrode gemessen. Nachdem sich ein Potential eingestellt hatte, wurde ein UV-Vis Spektrum (Lambda11 Photometer; Tabelle 6) des Proteins aufgenommen und anhand der Absorption die Peakhöhe des Soret-Peaks bestimmt. Die Peakhöhe im Spektrum, des vollständig oxidierten Proteins wurde 0, des komplett reduzierten Proteins 1, gesetzt. Die Werte dieser normalisierten Absorption konnten gegen das eingestellte Potential aufgetragen werden und mittels der Nernst-Gleichung eine Simulation für das Redoxpotential der Häme errechnet werden (2.8.10).

#### 2.8.12. Redoxpotential-Bestimmung mit optisch transparenter $\text{SnO}_2$ Elektrode

Diese Methode wurde von Sam Rowe von der University of East Anglia (Norwich, UK) aus der Kooperationsarbeitsgruppe von Prof. Julea Butt durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte mit einer Zinnoxid-Elektrode, Potentiale wurden über ein Potentiometer einge-

stellt und über die Zinnoxid- und eine Platinelektrode auf das Protein in der Küvette übertragen. Als Referenz diente eine Silberchloridelektrode. Das Protein wurde in 50 mM HEPES Puffer, 50 mM NaCl pH 7,5 gebracht und ohne Redoxmediatoren auf die optisch transparente Zinnoxid-Elektrode aufgetragen. Jeweils nach 50 mV wurde ein UV-Vis Spektrum des Proteins aufgezeichnet und anhand der Absorptionsmaxima konnten die Peakhöhen des Soret-, des  $\alpha$ - und des  $\beta$ -Peaks bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte analog zu 2.8.10 und 2.8.11 über eine Simulation mit Hilfe der Nernst-Gleichung.

## 2.9. Anaerobes Arbeiten

Damit enzymatische Reaktionen mit Methylviologen als Elektronendonator durchgeführt werden konnten (2.8.8), wurde eine anaerobe Umgebung benötigt (max. 200 ppm O<sub>2</sub>). Beim anaeroben Arbeiten wurden Versuche in einem Anaerobenzelt (Tabelle 6), welches über eine Schleuse be- (N<sub>2</sub> und Formiergas) und entgast (Vakuum) wurde, durchgeführt. Alle im Anaerobenzelt verwendeten Puffer und Lösungen wurden vorher entgast (1 Std/L) und/oder mit Stickstoff begast (30 Sek./mL).

### 2.9.1. Herstellung von Titan (III) citrat Lösung (Zehnder und Wuhrmann 1976)

In einem ersten Schritt wurde eine gesättigte Kaliumcarbonat Lösung (2.1.1) angesetzt. Im Folgenden wurden 4,86 g Natriumcitrat (2.1.1) in 48 mL H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> gelöst und 10 min lang mit Stickstoff begast. Anschließend wurden 9,38 mL 12 %ige Titan (III)-chlorid Lösung (2.1.1) dazu gegeben und unter Rühren mit der gesättigten Kaliumcarbonat Lösung der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

## 2.10. Kristallographie

Um Kristalle eines Proteins zu erhalten muss dieses in sehr hoher Konzentration (2 – 10 mg/mL) und in einem hohen Reinheitsgrad vorliegen. Das Protein wird mit einem spezifischen Puffer, meist mit hohem Salz oder Polyethylenglykol (PEG) Anteil, vermischt und über Wochen inkubiert bis über die Diffusion von Wasser aus der Proteinlösung eine Übersättigung stattfindet und das Protein in die Nukleationsphase eintritt (Abbildung 12).

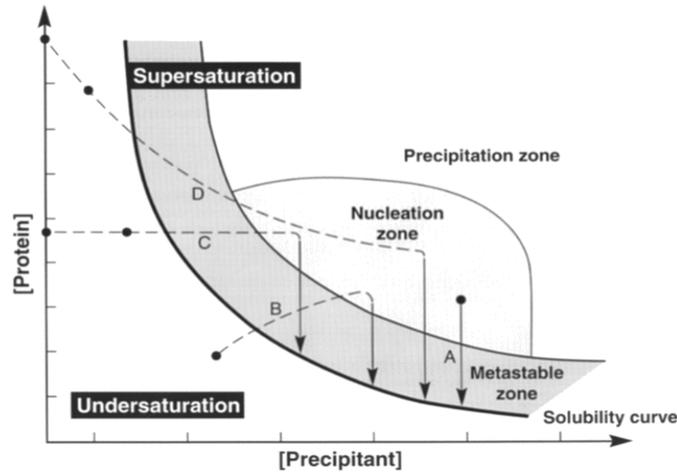


Abbildung 12: Phasendiagramm (journals.iucr.org)

Es gibt zwei verschiedene Methoden Proteine zu kristallisieren:

1. **Hanging/Sitting drop:** Ein Proteintropfen mit einer niedrigen Konzentration an Fällungsmitteln befindet sich seitlich oder oben am Rand eines Gefäßes, welches einen Puffer mit einer hohen Konzentration an Fällungsmitteln enthält (Abbildung 13). Über Diffusion von Wasser aus dem Proteintropfen kommt es zu einer Übersättigung an Fällungsmitteln und das Protein tritt in die Nukleationsphase ein und kristallisiert.

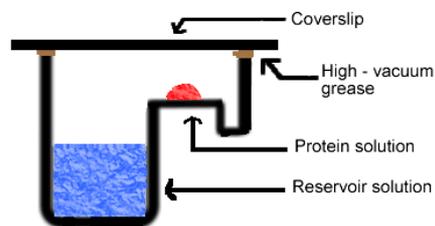


Abbildung 13: Sitting drop Methode

2. **Diffusion über die Phasengrenze:** Die Proteinlösung und Fällungslösung werden in eine Kapillare mit einer gemeinsamen Phasengrenze in Kontakt gebracht. Die Fällungslösung kann durch die viel geringere Teilchengröße durch die Grenzfläche diffundieren und führt zu einer Übersättigung in der Proteinlösung.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Biochemische, kinetische und strukturelle Charakterisierung des AvTsdA Wildtyp-Proteins

Schwerpunkt der Arbeit sollte die Charakterisierung der TsdA aus *A. vinosum* sein. Eine Funktion als Thiosulfatdehydrogenase konnte dem Protein *in vivo* bereits zugeordnet werden (Denkmann et al. 2012) und auch erste Erkenntnisse über die Funktionalität *in vitro* wurden schon gewonnen (Denkmann 2011). Die Aufklärung der Struktur ermöglichte nun eine umfassende biochemische Charakterisierung der AvTsdA.

##### 3.1.1. Struktur der Thiosulfatdehydrogenase aus *A. vinosum*

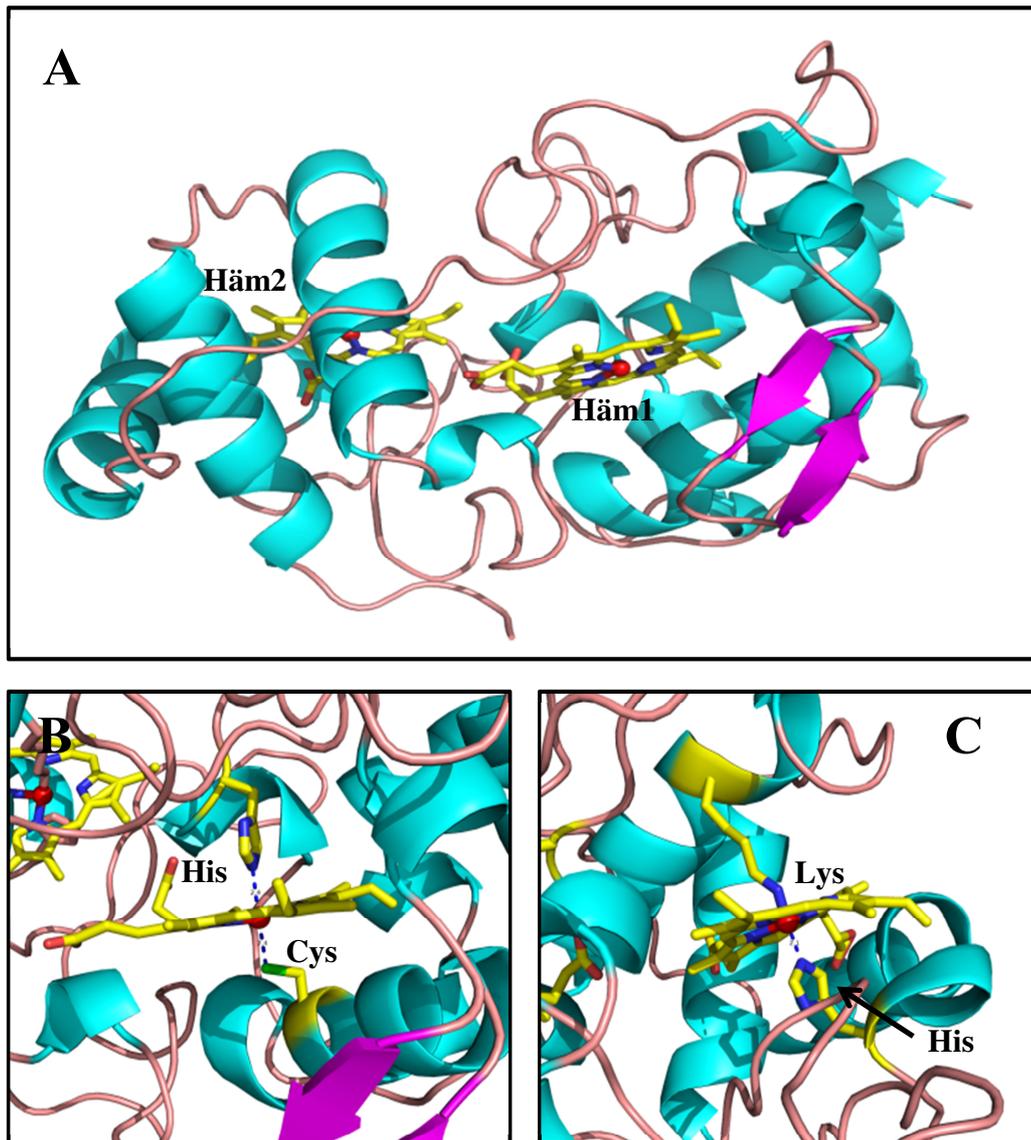
Die TsdA aus *A. vinosum* wurde in *E. coli* BL21 Zellen produziert (2.4.1), aufgereinigt (2.5.1 und 2.7.1) und auf 12 mg/mL Protein konzentriert. TsdA-Kristalle konnten aus der hoch konzentrierten Proteinlösung über die „Sitting-drop Methode“ (2.10) mittels eines PEG/BisTris Puffers pH 6,28 gefällt werden (2.10; Abbildung 13). Die Erstellung von Kristallen und der Kristallstruktur wurde, während eines Forschungsaufenthaltes in Portugal, von Dr. José Brito im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Margarida Archer (ITQB, Oeiras; Portugal) durchgeführt.

Das rekombinant aufgereinigte Protein wurde mit 23,5 % PEG 3350, 100 mM BisTris pH 6,28, 200 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und 100 mM NaI als Fällungsmittel versetzt. Der finale Kristall (Abbildung 14) enthielt 25,4 % PEG 3350, 92,5 mM BisTris pH 6,28, 185 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 100 mM NaI und 5 % PEG 400 (Brito et al. 2014).



**Abbildung 14:** Kristalle der TsdA aus *A. vinosum*. Die Abbildung wurde von Dr. José Brito zur Verfügung gestellt.

AvTsdA Kristalle wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Röntgendiffraktometrie (Beugung von Röntgenstrahlen am Kristall) am Synchrotron in Alba (Spanien) konnte die Struktur von TsdA mit einer Auflösung von 2,0 Å aufgeklärt werden. Die erhaltenen Kristalle wurden über Röntgendiffraktometrie analysiert und die Struktur aus den gewonnenen Daten errechnet.



**Abbildung 15:** Struktur der Thiosulfatdehydrogenase aus *A. vinosum* im oxidierten Zustand. A: vollständige Struktur der TsdA. B: Darstellung der Umgebung von Häm 1 mit den Häm-Eisen koordinierenden Aminosäuren (His<sub>53</sub>/Cys<sub>96</sub>). C: Darstellung der Umgebung von Häm 2 mit den Häm-Eisen koordinierenden Aminosäuren (His<sub>164</sub>/Lys<sub>208</sub>). Die Abbildung wurde von Dr. José Brito zur Verfügung gestellt und modifiziert.

In Abbildung 15 ist die native Struktur der Thiosulfatdehydrogenase im oxidierten Zustand dargestellt. Abbildung 15 A zeigt die komplette Struktur des Proteins im oxidierten Zustand, Abbildung 15 B und C zeigen bestimmte Ausschnitte der Struktur, um die beiden Häme mit ihren proximalen- und distalen axialen Liganden darzustellen. Wie in Abbildung 15 B zu erkennen wird eines der Häme von einem Histidin (His<sub>53</sub>) und einem Cystein (Cys<sub>96</sub>) ligiert (als Häm 1 bezeichnet in dieser Arbeit). Die Strukturanalyse bestätigte damit Ergebnisse, welche im Zuge der Diplomarbeit über EPR-Spektroskopie erhalten werden konnten (Denkmann et al. 2012). Die Thiosulfatdehydrogenase ist ein *c*-Typ Cytochrom mit einer ungewöhnlichen His/Cys-Ligation an einem der beiden kovalent gebundenen Häme (1.2.1). Wie in Abbildung 15 C dargestellt, wird das andere Häm im

oxidierten Zustand von einem Histidin (His<sub>164</sub>) und einem Lysin (Lys<sub>208</sub>) ligiert (als Häm 2 bezeichnet in dieser Arbeit). Lysin agiert hier als distaler Ligand des gebundenen Häm-Eisen. Diese Art der Häm-Eisen-Koordination konnte bisher nur im Pferdeherz Cytochrom *c* nachgewiesen werden (Schweitzer-Stenner et al. 2007; Verbaro et al. 2009).

Um auf den Mechanismus der Thiosulfatdehydrogenase schließen zu können wurden zusätzlich zur nativen Struktur, Kristalle mit den beiden Substraten der TsdA, Thiosulfat und Tetrathionat, versetzt. Bei der Strukturanalyse der mit Thiosulfat versetzten Probe stellte sich heraus, dass Häm 1 über drei Sauerstoffatome, welche an das Cystein gebunden sind, koordiniert wird (Tabelle 12). Diese Probe wurde, vermutlich während des Analyseprozesses, teilweise oxidativ geschädigt. Häm 2 wird, bei der mit Thiosulfat versetzten Probe, von Histidin<sub>164</sub> und Methionin<sub>209</sub> koordiniert. Thiosulfat als Substrat der TsdA, ist in der Lage das Protein teilzu-reduzieren (Denkmann et al. 2012) und führt einen Wechsel des distalen Liganden von Häm 2 herbei. Im Gegensatz dazu kann Tetrathionat keine Änderung des Liganden an Häm 2 bewirken. Bei allen drei Proben blieb die His<sub>164</sub>/Lys<sub>208</sub>-Koordination von Häm 2 bestehen (Tabelle 12). Eine Zugabe von Tetrathionat zur reduzierten TsdA steht noch aus, um eine mögliche Reoxidation des Proteins zu beobachten. Erste Hinweise hierfür liefert die spektroskopische Analyse des Proteins (3.1.3).

**Tabelle 12: Zusammenfassung der Kristallstruktur-Analysen von AvTsdA**

Nummer	Protein	Redoxstatus	Häm 1	Häm 2	Zusatz	Auflösung [Å]
2	TsdA	oxidiert	His/Cys	His/Lys	-	2,00
6	TsdA	teil-reduziert	His/Cys-3O*	His/Met	Thiosulfat	1,66
17	TsdA	oxidiert	His/Cys-S	His/Lys	Tetrathionat	1,64
18	TsdA	oxidiert	His/Cys-S	His/Lys	Tetrathionat	1,61
10	TsdA	reduziert	Hys/Cys-2O*-S	His/Met	Dithionit	1,75
9	TsdA	reduziert	Hys/Cys-2O*-S	His/Met	Dithionit	1,51

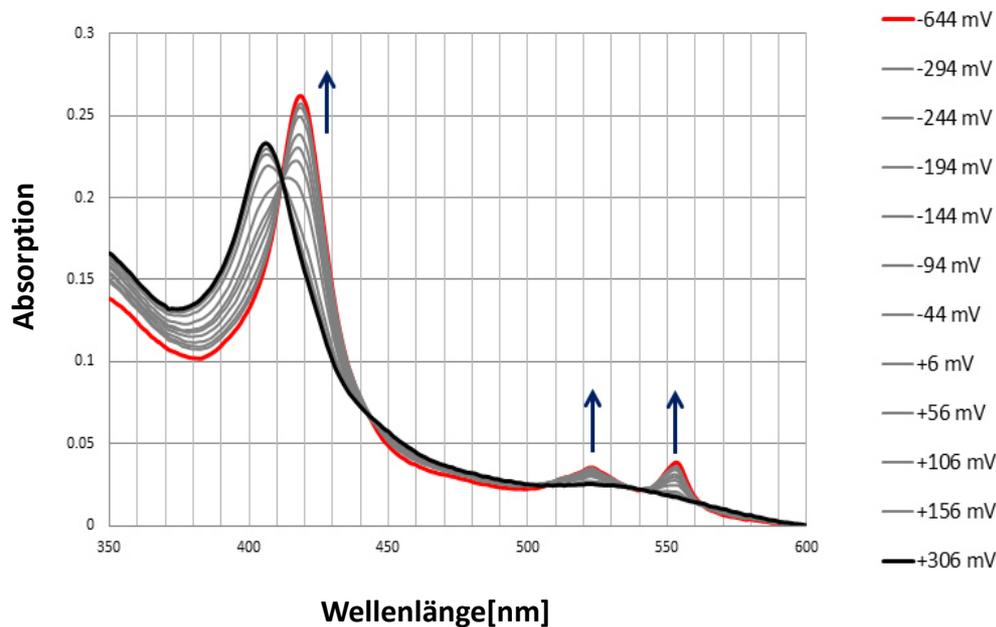
\*: Sauerstoffatome zeigen oxidativ geschädigtes Cystein an

Die, mit Natriumdithionit reduzierten TsdA-Proben, wiesen an Häm 2 eine His<sub>164</sub>/Met<sub>209</sub>-Koordination des Häm-Eisens auf. Eine komplette Reduktion des Proteins, geht genau wie bei einer Teilreduktion durch Thiosulfat, mit einem Ligandenwechsel von K<sub>208</sub> zu M<sub>209</sub> einher (Tabelle 12).

### 3.1.2. Bestimmung des Redoxpotentials der AvTsdA Häme

Neben der strukturellen Aufklärung der Häm-Eisen-Koordination muss für ein Verständnis des enzymatischen Mechanismus das Redoxpotential der Häme bekannt sein. Zu die-

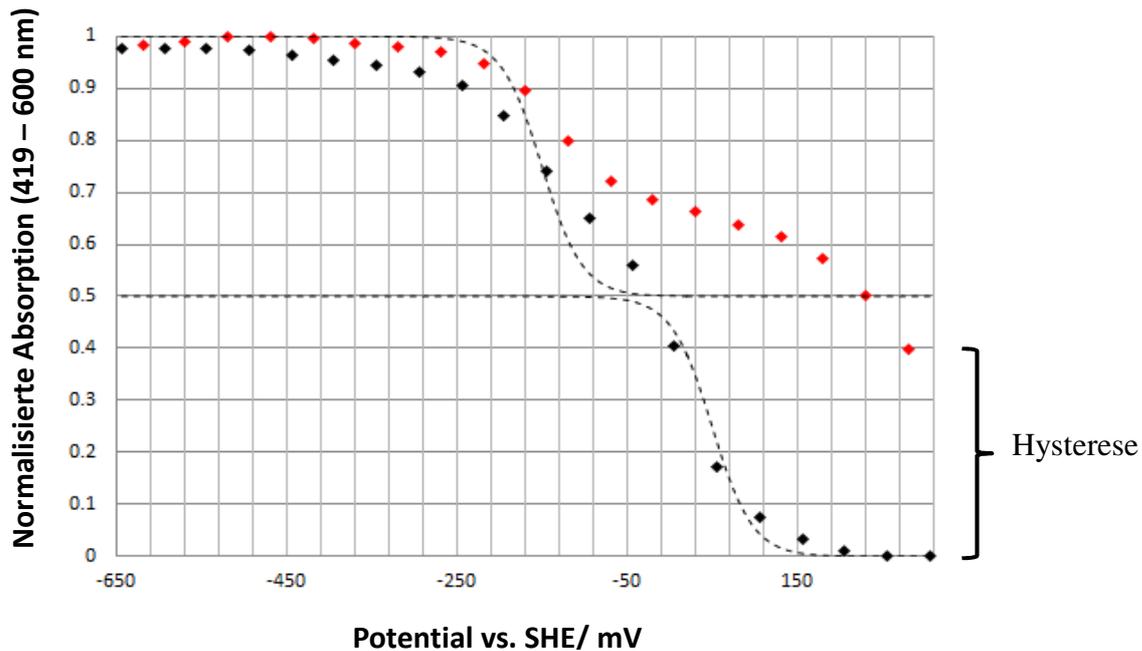
sem Zweck wurde das Redoxpotential von AvTsdA von Sam Rowe im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Julea Butt (Norwich, UK) bestimmt.



**Abbildung 16:** Absorptionsspektren des TsdA Wildtyp-Proteins bei verschiedenen angelegten Potentialen. In schwarz ist das oxidierte Spektrum und in rot das komplett reduzierte Spektrum dargestellt. Blaue Pfeile weisen auf starke Änderungen der Absorptionsmaxima hin. 50  $\mu$ M TsdA Wildtyp-Protein wurden mit 2 mM Neomycin versetzt. 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 2 mM Neomycin pH 7,0 diente als Puffer. Das angegebene Potential bezieht sich auf die Standard-Wasserstoff-Elektrode (SHE). Modifizierte Abbildung von Sam Rowe.

In Abbildung 16 sind Absorptionsspektren des TsdA Wildtyp-Proteins bei verschiedenen angelegten Spannungen zu erkennen. Bei einer Spannung von + 306 mV befand sich das Protein im komplett oxidierten Zustand und konnte mit einer schrittweisen Verringerung auf eine Spannung von - 644 mV in den vollständig reduzierten Zustand gebracht werden. Anhand der aufgenommenen UV-Vis Spektren konnte die Höhe des Soret-Peaks, des  $\alpha$ - und des  $\beta$ - Peaks bestimmt werden. Die Peakhöhe im vollständig oxidierten Zustand wurde 0 und im vollständig reduzierten Zustand 1 gesetzt. Über die Nernst-Gleichung konnten zwei mögliche Simulationen erstellt werden.

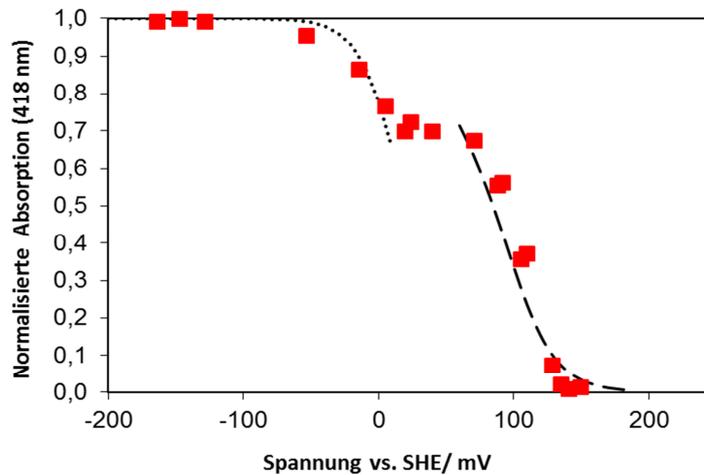
In Abbildung 17 sind die Werte für die Reduktion und Oxidation des Proteins dargestellt, sowie daraus abgeleitete Simulationen, die über die Nernst-Gleichung berechnet wurden. Die Reoxidation des Proteins unterscheidet sich stark von der Reduktion des Proteins, deshalb kann von einer Hysterese der AvTsdA ausgegangen werden.



**Abbildung 17:** Reduktion und Reoxidation von TsdAwt dargestellt über die Änderung der Absorption bei 419 nm relativ zu der bei 600 nm gegen die angelegte Spannung. Zur Erstellung der Simulation mittels der Nernst-Gleichung (gestrichelte Linien) wurde die kleinste Zahl 0 (vollständig oxidiertes Zustand), die höchste Zahl 1 gesetzt (vollständig reduzierter Zustand). Schwarze Rauten stellen die Reduktion, rote Rauten die Reoxidation des Proteins dar. Modifizierte Abbildung von Sam Rowe.

Die Hysterese der TsdA ist ein Hinweis auf den Ligandenwechsel, der an Häm 2 von Lysin zu Methionin stattfindet (3.1.1), da durch die Änderung des Liganden im reduzierten Zustand des Proteins, das Redoxpotential des Hämes stark verändert werden kann. Aus den beiden möglichen Simulationen konnten über das mittlere Potential der angelegten Kurven ungefähre Werte für das Redoxpotential der beiden Häme ermittelt werden. Die errechneten Potentiale betragen - 150 mV und + 50 mV. Allerdings ist in Abbildung 17 eindeutig zu erkennen, dass die beiden angepassten Simulationen die Werte nur bedingt widerspiegeln und nicht alle Datenpunkte in der Simulation erfasst werden konnten. Außerdem stellt der Wert + 50 mV nicht das Potential eines Hämes sondern einer Häm-Population aus mindestens zwei verschiedenen Häm Zuständen dar, was auf den Ligandenwechsel zurückgeführt werden kann, und aus Differenzspektren der TsdA bei verschiedenen angelegten Spannungen hervorgeht (nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurde zusätzlich zur Bestimmung des Redoxpotentials mittels der optisch transparenten Zinnoxid-Elektrode durch Sam Rowe, im Rahmen dieser Arbeit eine Bestimmung mit Hilfe von Natriumdithionit durchgeführt. Das Potential wurde durch die Zugabe einer definierten Menge Natriumdithionit eingestellt und der Redoxstatus des Proteins über ein UV-Vis Spektrum anhand der Peakhöhe des Soret-Peaks verfolgt. Diese Methode ermög-

lichte eine etwas detailliertere Bestimmung des Redoxstatus, alle 10 – 20 mV, während bei der potentiometrischen Analyse nur alle 50 mV ein Spektrum aufgezeichnet wurde.



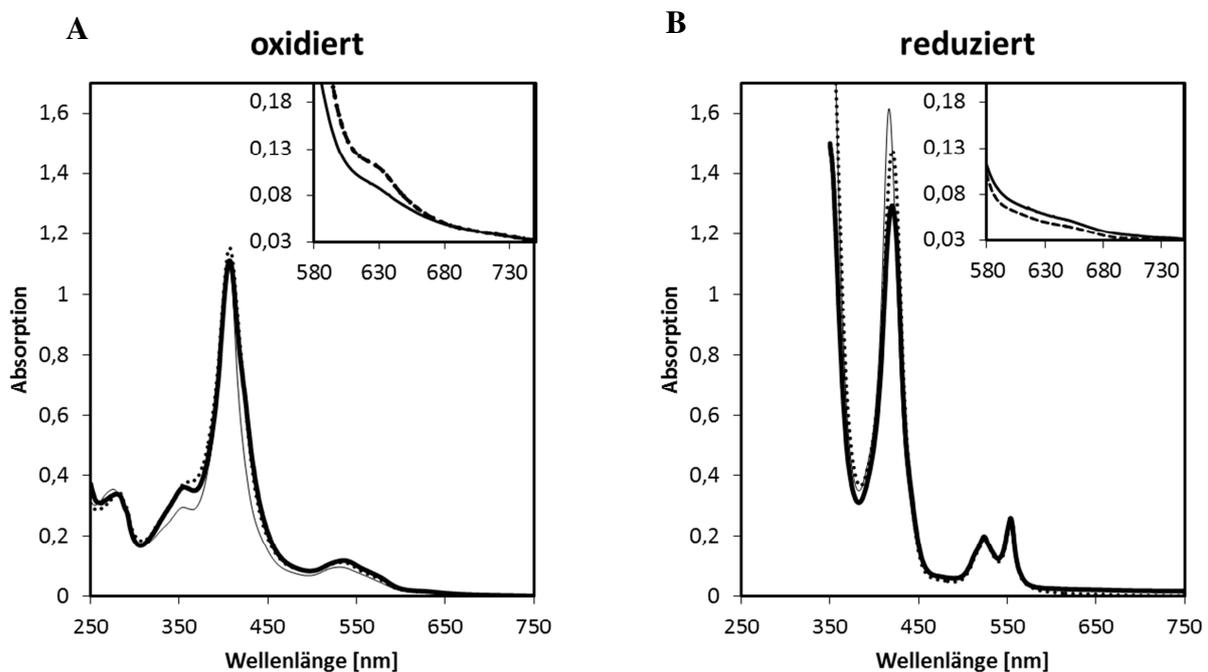
**Abbildung 18:** Reduktion von TsdAwt, dargestellt über die normalisierte Absorption bei 418 nm gegen die angelegte Spannung in mV. Zur Erstellung der Simulation wurde die kleinste Zahl 0 (vollständig oxidiertes Zustand) und die höchste Zahl 1 gesetzt (vollständig reduzierter Zustand). Unter Berücksichtigung verschiedener Potentiale für das Protein konnten zwei Simulationen mit Hilfe der Nernst-Gleichung erstellt werden (gepunktete und gestrichelte Linie).

In Abbildung 18 ist die normalisierte Absorption des Soret-Peaks gegen die angelegte Spannung dargestellt. Die Spannung wurde in diesem Versuch nur von + 200 mV bis - 200 mV variiert, sodass der Fokus auf der Bestimmung des Redoxpotentials für die Häm Populationen, welche bislang unter einem Potential  $E_m$  von + 50 mV zusammengefasst wurden, lag. Zur Definition des Redoxpotentials und um die gemessenen Werte sinnvoll darstellen zu können wurden zwei mögliche Simulationen über die Nernst-Gleichung benötigt. Die aus den Simulationen errechneten Potentiale betragen + 20 mV (gepunktete Linie, Abbildung 18) und + 80 mV (gestrichelte Linie, Abbildung 18). Die Bestimmung des Redoxpotentials mit Natriumdithionit deckt nur einen geringeren Spannungsunterschied ab, weshalb die beiden errechneten Potentiale zwar zwei verschiedenen Häm Populationen zuzuordnen sind, aber vermutlich nur Änderungen des Potentials an einem Häm wiedergeben. Sowohl die manuelle als auch die potentiometrische Methode der Redoxtitration weisen damit auf einen Ligandenwechsel an einem der beiden Häme hin.

### 3.1.3. Spektroskopische Analyse des AvTsdA Wildtyp-Proteins

Eine erste spektroskopische Analyse von TsdA wurde bereits 2011 durchgeführt und ist als Abbildung 3 in Denkmann et al. 2012 veröffentlicht worden. Wichtige Charakteristika waren eine Verschiebung des Soret-Peaks von 407 nm im Spektrum des oxidierten Proteins zu 420 nm im Spektrum der reduzierten TsdA, ein  $\alpha$ -Peak bei 554 nm, ein  $\beta$ -Peak

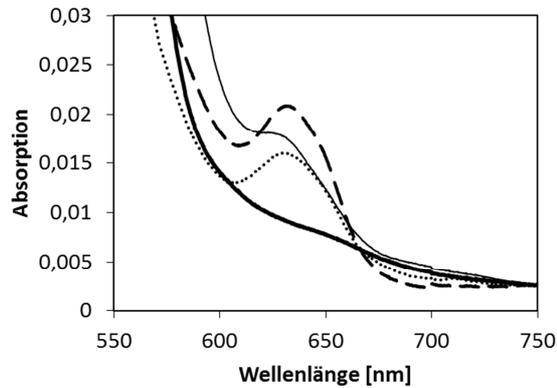
bei 524 nm und ein weiteres Absorptionsmaximum im langwelligen Bereich bei 634 nm. Nach der Addition von 2 mM Thiosulfat konnte das Protein teil-reduziert werden und über Addition von Natriumdithionit wurde eine komplette Reduktion der TsdA erreicht. Ein Absorptionsmaximum bei 634 nm war im reduzierten Zustand nicht mehr detektierbar. Die erste spektrale Analyse der TsdA erfolgte bei einem pH-Wert von 8,0, bei dem das Protein katalytisch inaktiv ist (Denkmann et al. 2012). Für eine vollständigere Charakterisierung wurden Spektren bei pH 6,5 (bei diesem pH-Wert wurde die Kristallstruktur gewonnen) und pH 5,0 (bei diesem pH-Wert ist das Protein katalytisch aktiv) aufgenommen.



**Abbildung 19:** UV-Vis Spektren von TsdAwt im oxidierten und reduzierten Zustand bei verschiedenen pH-Werten. Spektren von rekombinantem TsdA Wildtyp-Protein ( $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $5,9 \mu\text{M}$ ) bei pH 5,0 (dünne Linie), pH 6,5 (gepunktete Linie) und pH 8,0 (dicke Linie) im oxidierten (Abbildung A) und im reduzierten Status (Abbildung B) wurden in 100 mM Ammonium Acetat Puffer (pH 5,0), 50 mM BisTris-HCl Puffer (pH 6,5) oder 50 mM Tris-HCl Puffer aufgenommen. Oxidation wurde erreicht durch die Addition von  $7 \mu\text{M}$  Ferricyanid, Reduktion durch die Addition von 10 mM Natriumdithionit. Vergrößert dargestellt ist in Abbildung A und B jeweils der Bereich von 580 nm – 750 nm eingefügt ( $640 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $23,7 \mu\text{M}$ ).

Im oxidierten Zustand des Proteins sind zwei wesentliche Unterschiede zwischen den UV-Vis Spektren bei verschiedenen pH-Werten zu erkennen. Der  $\delta$ -Peak unterscheidet sich in der Intensität der Absorption, wobei diese bei pH 5,0 deutlich geringer als bei pH 6,5 oder pH 8,0 ist. Außerdem tritt im Spektrum bei pH 5,0 im Gegensatz zu pH 6,5 und pH 8,0 kein Absorptionsmaximum bei 634 nm im oxidierten Zustand auf (Abbildung 19 A). In UV-Vis Spektren des reduzierten Proteins unterscheidet sich der Soret-Peak in seiner Intensität und der Wellenlänge des Absorptionsmaximums zwischen den verschie-

denen pH-Werten. Bei pH 5,0 hat der Soret-Peak sein Absorptionsmaximum bei 416,6 nm und eine Intensität von 1,62 im UV-Vis Spektrum. In Spektren bei höheren pH-Werten von 6,5 und 8,0 liegen die Absorptionsmaxima des Soret-Peaks bei 419,8 nm und die Intensität leicht niedriger bei 1,39 bzw. 1,24 (Abbildung 19 B).



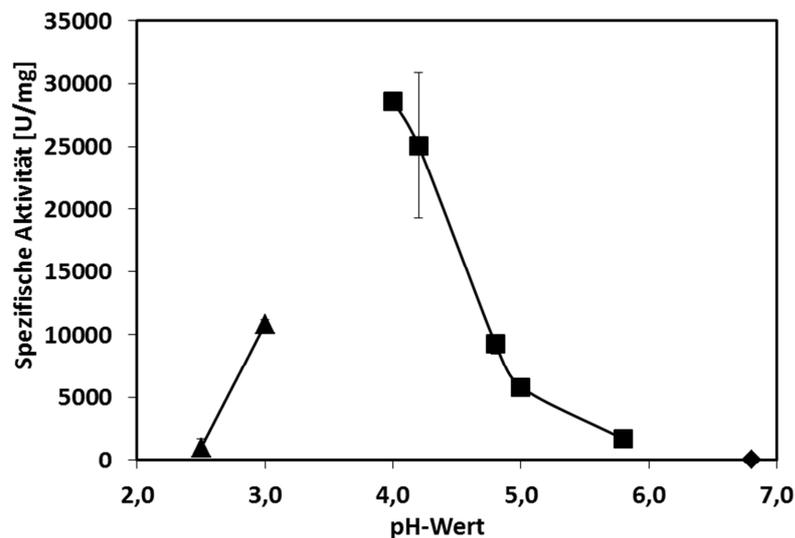
**Abbildung 20:** Spektrale Analyse des TsdA Wildtyp-Proteins im langwelligen Bereich. Vergleich von UV-Vis Absorptionsspektren (550 – 750 nm) für das TsdA Wildtyp-Protein ( $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $5,9 \mu\text{M}$ ) im oxidierten (dünne Linie), Thiosulfat-reduzierten (gepunktete Linie), teil-reduzierten (gestrichelte Linie) und komplett reduzierten (dicke Linie) Zustand. Eine Teilreduktion wurde durch die Addition von 1 mM Natriumdithionit, eine vollständige Reduktion durch die Addition von 10 mM Natriumdithionit erreicht. Für den Thiosulfat-reduzierten Zustand wurden 2 mM Thiosulfat hinzu gegeben. Alle Spektren wurden in 50 mM BisTris-HCl Puffer pH 6,5 aufgenommen.

Im UV-Vis Spektrum des oxidierten Zustandes des TsdA-Proteins konnte ein Peak bei 634 nm detektiert werden (Abbildung 19 A). In Abbildung 20 sind Spektren der teil-reduzierten TsdA im Vergleich zu Spektren der oxidierten und reduzierten TsdA bei pH 6,5 dargestellt. Die UV-Vis Analyse zeigte, dass ein Absorptionsmaximum bei 634 nm auch auftritt wenn das Protein mit geringen Mengen Thiosulfat (2 mM) oder Natriumdithionit (2 mM) versetzt wird, jedoch nicht im komplett reduzierten Zustand. In den Spektren der teil-reduzierten TsdA ist die Intensität des Peaks deutlich ausgeprägter als im Spektrum des oxidierten Proteins (Abbildung 20). Das Absorptionsmaximum bei 634 nm ist also besonders charakteristisch für einen intermediären Zustand des TsdA Wildtyp-Proteins.

#### 3.1.4. Kinetische Charakterisierung des AvTsdA Wildtyp-Proteins

Erste Erkenntnisse über die katalytische Aktivität der TsdA wurden schon in der Diplomarbeit (Denkmann 2011) gewonnen. Eine hohe spezifische Aktivität über 10.000 U/mg für die Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat wurde bei einer Konzentration von 2 mM Thiosulfat und bei einem pH-Wert von 4.0 gemessen (Denkmann 2011). Um eine detaillierte Charakterisierung des Enzyms zu ermöglichen wurde zunächst das pH-Optimum der katalytischen Aktivität der TsdA bestimmt. Damit die maximalen Aktivitäts-

ten bei allen pH-Werten gemessen werden konnten, wurden Konzentrationen von 8 mM Thiosulfat und 1 mM Ferricyanid gewählt, bei denen die spezifische Aktivität der TsdA im Sättigungsbereich liegt (nicht dargestellt). In Abbildung 21 ist die spezifische Thiosulfatdehydrogenase-Aktivität der AvTsdA in Abhängigkeit des pH-Wertes dargestellt. Eine maximale spezifische Aktivität von 29.125 U/mg konnte bei pH 4,0 für die TsdA gemessen werden. Diese Aktivität war mit einem  $V_{\max}$  von 5.825 U/mg fünfmal niedriger bei pH 5,0 im Vergleich zu pH 4,0. Im neutralen pH-Bereich konnte keine katalytische Aktivität festgestellt werden (Abbildung 21). Weitere Versuche zur spezifischen Aktivität der Thiosulfat-Oxidation von TsdA wurden bei den pH- Werten 4,0 und 5,0 durchgeführt, bei denen für das Enzym die vergleichsweise höchsten katalytischen Aktivitäten festgestellt werden konnten.



**Abbildung 21:** pH Optimum des TsdA Wildtyp-Proteins. Dargestellt ist die spezifische Aktivität für die Oxidation von Thiosulfat durch TsdA ( $0,069 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $0,026 \text{ nM}$ ) bei einer Konzentration von 8 mM Thiosulfat mit 1 mM Ferricyanid als artifiziellem Elektronenakzeptor gegen den pH-Wert. Die pH-Werte 2,5 und 3,0 wurden mit 100 mM Citronensäure Puffer, die pH-Werte 4,0 – 5,8 mit 100 mM Acetatpuffer und pH 6.8 mit 100 mM Tris-HCl Puffer eingestellt.

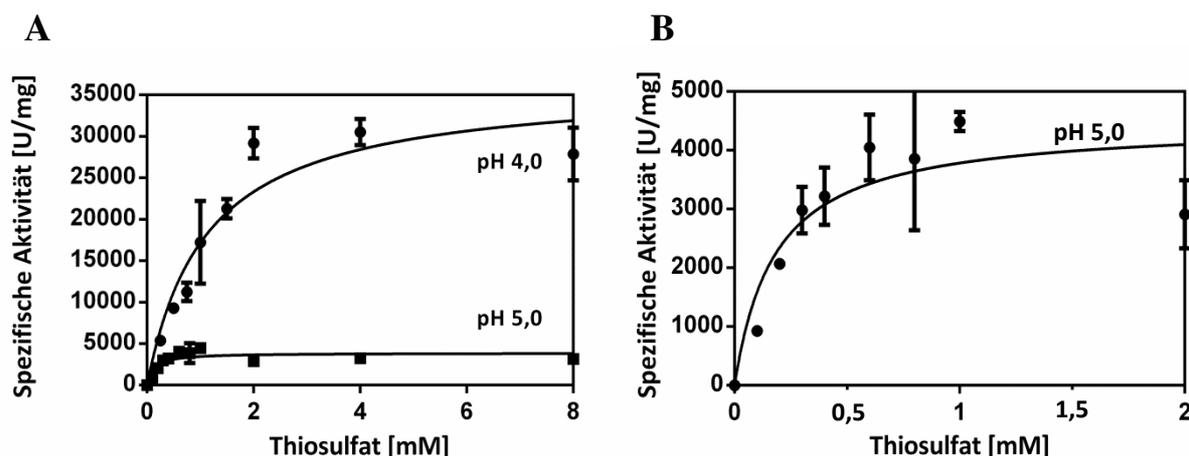
Bei der Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat werden zwei Moleküle desselben Substrates umgesetzt, weshalb eine Analyse über die Michaelis-Menten Kinetik nicht durchgeführt werden konnte, da für dies selbige gilt: „Nur ein einzelnes Substrat und ein einzelner Enzym-Substrat Komplex sind involviert, wobei der Enzym-Substrat-Komplex sofort auseinander fällt um freies Enzym und Substrat zu bilden“ (Segel 1993). Wenn der genaue Mechanismus der Reaktion nicht bekannt ist, ist es sinnvoll die Hill Gleichung zu verwenden, welche die am häufigsten verwendete Methode der kinetischen Analyse darstellt (Segel 1993).

$$v/V_{\max} = [S]n/(K' + [S]n)$$

**(Hill 1910)**

V = Geschwindigkeit,  $V_{\max}$  = maximale Geschwindigkeit, [S] = Substratkonzentration, n = Substratbindestellen,  $K' = K_{sn}$  = Dissoziationskonstante

Im Folgenden wurde deshalb die Analyse nach Hill als Methode gewählt um  $S_{[0.5]}$ - und  $k_{\text{cat}}$ -Werte für die kinetische Analyse von AvTsdA und AvTsdA-Varianten zu bestimmen.

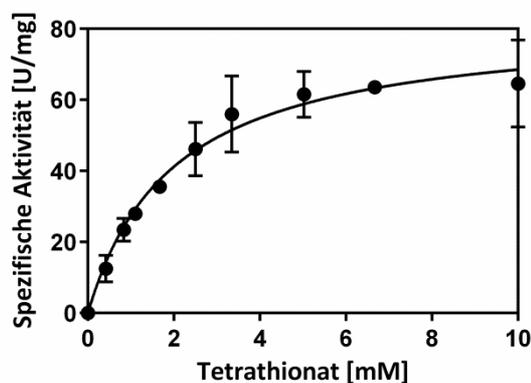


**Abbildung 22:** Thiosulfat-Oxidation zu Tetrathionat katalysiert durch TsdAwT in Abhängigkeit von der Thiosulfat Konzentration. A: Spezifische Aktivität der Thiosulfat-Oxidation durch TsdA (pH4.0: 0,069  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,026 nM; pH 5.0: (0,252  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 0,095 nM) in Abhängigkeit von der Thiosulfat Konzentration bei pH 4,0 und pH 5,0. B: Vergrößerte Darstellung der pH 5,0 Kurve bei Thiosulfat Konzentrationen von 0 - 2 mM. Die Abbildungen wurden mit GraphPad Prism (Tabelle 5) erstellt.

Die detaillierte Analyse der Thiosulfat-abhängigen Reduktion des artifiziellen Elektronenakzeptors Ferricyanid ( $\epsilon_{420\text{nm}} = 1,09 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ; (Friedrich et al. 1989) ) ergab deutliche Unterschiede, welche schon bei der Bestimmung des pH-Optimums (Abbildung 21) festgestellt werden konnten, zwischen den pH-Werten pH 4,0 und pH 5,0. In Abbildung 22 sind Kinetiken bei pH 4,0 und pH 5,0 der Thiosulfat-abhängigen Ferricyanid-Reduktion, katalysiert durch die AvTsdA, dargestellt. Messungen der katalytischen Aktivität der TsdA bei einem pH-Wert von 4,0 ergaben einen  $V_{\max}$  von  $28.600 \pm 2500 \text{ U/mg}$  und eine Substrataffinität zu Thiosulfat mit einem  $S_{[0.5]}$ -Wert von  $1,1 \pm 0,2 \text{ mM}$ . Aus diesen Werten ergab sich eine Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  von  $14.000 \text{ s}^{-1}$  und als Wert für die katalytische Effizienz  $k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$  von  $12.727 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Denkmann et al. 2012). Die maximale Aktivität der Thiosulfat-Oxidation durch TsdA bei pH 5,0 war fünfmal geringer als bei pH 4,0 mit einem  $V_{\max}$  von  $4468 \pm 425 \text{ U/mg}$ . Im Gegensatz dazu stieg die Substrataffinität auf einen  $S_{[0.5]}$ -Wert von  $0,18 \pm 0,06 \text{ mM}$ , ein signifikanter Anstieg um den Faktor 10 (Abbildung 22, A und B). Die höhere Affinität zum Substrat Thiosulfat spiegelte sich auch in einer gestiegenen katalytischen Effizienz  $k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$  von  $14.061 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  wieder

( $k_{\text{cat}} = 2013 \text{ s}^{-1}$ ). Die Thiosulfatdehydrogenase setzt mit einer höheren katalytischen Effizienz zwei Moleküle Thiosulfat zu einem Molekül Tetrathionat bei pH 5,0 im Vergleich zu pH 4,0 um.

Deutlich weniger effizient kann die Thiosulfatdehydrogenase die Reaktion der Reduktion von einem Molekül Tetrathionat zu zwei Molekülen Thiosulfat katalysieren. Um die Gegenreaktion charakterisieren zu können wurde reduziertes Methylviologen als Elektronendonator eingesetzt, was eine Durchführung der kinetischen Analyse, bei komplett anaeroben Bedingungen notwendig machte. In Abbildung 23 ist die Kinetik der Tetrathionat-abhängigen Methylviologen-Oxidation, katalysiert durch die AvTsdA, dargestellt. Die maximale Aktivität der Reduktion von Tetrathionat durch das TsdA Wildtyp-Protein  $V_{\text{max}}$  betrug  $82 \pm 3,4 \text{ U/mg}$  und ist damit 370-fach geringer als die maximale spezifische Aktivität bei der Umsetzung von Thiosulfat. Die Affinität zum Substrat Tetrathionat wurde mit einem  $S_{[0,5]}$ -Wert von  $1,98 \pm 0,32 \text{ mM}$  berechnet, was einen  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $37 \text{ s}^{-1}$  ergab (Abbildung 23). Insgesamt war die katalytische Effizienz mit einem  $k_{\text{cat}}/S_{[0,5]}$ -Wert von  $18,7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  über 700-fach geringer als die katalytische Effizienz der Oxidation von Thiosulfat durch die AvTsdA. Die TsdA aus *A. vinosum* fungiert eher als Thiosulfatdehydrogenase und weniger als Tetrathionatreduktase (Liu et al.2013).



**Abbildung 23:** Tetrathionat-Reduktion zu Thiosulfat katalysiert durch TsdAwt in Abhängigkeit von der Tetrathionat Konzentration. Dargestellt ist die spezifische Aktivität der Tetrathionat-Reduktion des TsdAwt-Proteins ( $0,42 \mu\text{g mg}^{-1}$ ;  $0,16 \text{ nM}$ ) bei verschiedenen Tetrathionat Konzentrationen bei pH 5.0. Die Abbildung wurde mit GraphPad Prism (Tabelle 5) erstellt.

### 3.2. TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten

Eine detaillierte Analyse der Funktion von Häm 1 im Protein sollte durch den Austausch von Cystein<sub>96</sub> durch die Aminosäuren Glycin, Histidin und Methionin ermöglicht werden.

#### 3.2.1. Klonierung und Produktion von TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten

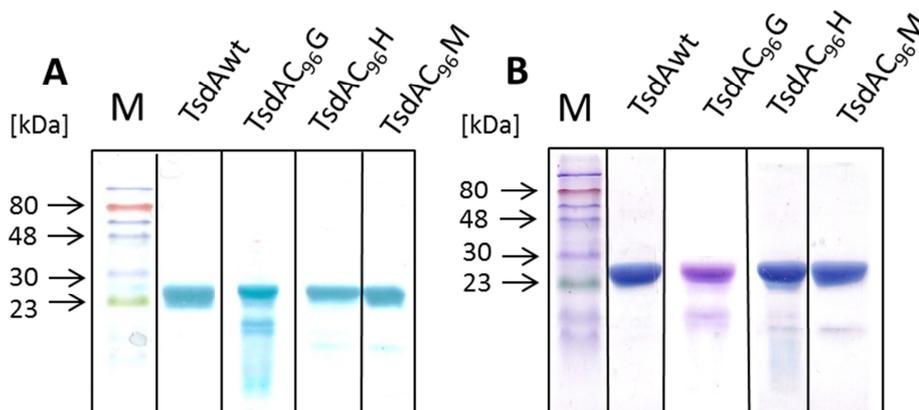
Bereits in der Diplomarbeit gelang es über zielgerichtete Mutagenese (2.3.2) die Expressionsplasmide pPR-IBAtsdAsCys<sub>96</sub>Glystrep (Denkmann et al. 2012) und pPR-IBAtsdAsCys<sub>96</sub>Hisstrep zu klonieren. Zur Erstellung des Expressionsplasmids pPR-IBAtsdAsCys<sub>96</sub>Metstrep wurde die Methode des GeneSOEING (2.3.2) verwendet. Alle Expressionsplasmide wurden jeweils zusammen mit dem pEC86-Vektor (Tabelle 10) in *E. coli* BL21 Zellen gebracht und die Proteine bei spezifischen Bedingungen produziert (2.4.1). Im Rahmen der Diplomarbeit konnten die Proteine TsdACys<sub>96</sub>Gly und TsdACys<sub>96</sub>His zwar bereits produziert werden, allerdings waren die aufgereinigten Proteine instabil und enthielten einen großen Anteil an teilweise zerfallenen Proteinfragmenten. Um dieses Problem zu beheben wurden größere Mengen an Protein produziert, deren Reinheitsgrad nach der Strep-Tag Affinitätschromatographie mittels einer Gelfiltration (2.7.1) weiter gesteigert wurde (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Vergleich des Reinheitsgrades von AvTsdA und der AvTsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten vor und nach der Gelfiltration**

Protein (pH 6.5)	Reinheitsgrad ( $E_{\text{Soret}}/E_{280\text{nm}}$ )		Ausbeute [ $\mu\text{g/L}$ <i>E. coli</i> Kultur]
	nach Affinitätschromatographie	nach Gelfiltration	
TsdAwt	1,8	3,3	571
TsdACys <sub>96</sub> Gly	1,6	4,1	178
TsdACys <sub>96</sub> His	1,2	4,1	107
TsdACys <sub>96</sub> Met	1,3	4,3	857

In Tabelle 13 sind die Reinheitsgrade des TsdA Wildtyp-Proteins und der verschiedenen TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten vor und nach der Gelfiltration angegeben. Der Reinheitsgrad wurde als Quotient der Absorptionsintensität des Soret-Peaks im oxidierten Zustand und der Absorptionsintensität bei 280 nm angegeben. Der Reinheitsgrad ist bei allen TsdA-Varianten mindestens doppelt so hoch, wenn eine weitere Aufreinigung, nach der Strep-Tag Affinitätschromatographie, mittels Gelfiltration erfolgte. Im Rahmen dieser Arbeit konnten deshalb nicht nur stabile TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten produziert werden, sondern auch qualitativ hochwertigeres TsdA Wildtyp-Protein gewonnen werden, das unter anderem zur Kristallisation (3.1.1) eingesetzt wurde.

Die absolute Ausbeute von TsdAC<sub>96</sub>M war mit 857 µg/L *E. coli*-Kultur am höchsten, sogar im Vergleich zur Ausbeute des TsdA Wildtyp-Proteins mit 571 µg/L *E. coli*-Kultur. Von den beiden TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten TsdAC<sub>96</sub>G und TsdAC<sub>96</sub>H konnten nur 178 µg/L *E. coli*-Kultur bzw. 107 µg/L *E. coli*-Kultur gewonnen werden. Die Unterschiede in der Ausbeute können durch eine deutlich schlechtere Qualität der aufgereinigten Proteine TsdAC<sub>96</sub>G und TsdAC<sub>96</sub>H vor der Gelfiltration erklärt werden. Anhand des Reinheitsgrades ist diese Differenz nicht auszumachen, da ein großer Proteinanteil mit Häm beladen war, aber nicht die richtige Größe aufwies, sondern als Spaltprodukt vorlag. In Abbildung 24 ist eine Häm- und Coomassiefärbung (2.5.5 und 2.5.6) des TsdA Wildtyp-Proteins und aller produzierten TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten dargestellt. Alle Proteine konnten sauber aufgereinigt werden, waren mit Häm beladen und bei einer erwarteten Größe von 27,2 kDa (inklusive zwei gebundener Häme und Strep-Tag) in beiden dargestellten Färbungen sichtbar. Das TsdAC<sub>96</sub>G Protein enthielt noch, im Vergleich zu den anderen Proteinen, größere Mengen einer Proteinfraction unterhalb von 20 kDa, wobei es sich nur um ein Spaltprodukt des Proteins handeln konnte, da diese Fraktion auch in der Häm Färbung sichtbar war (Abbildung 24).

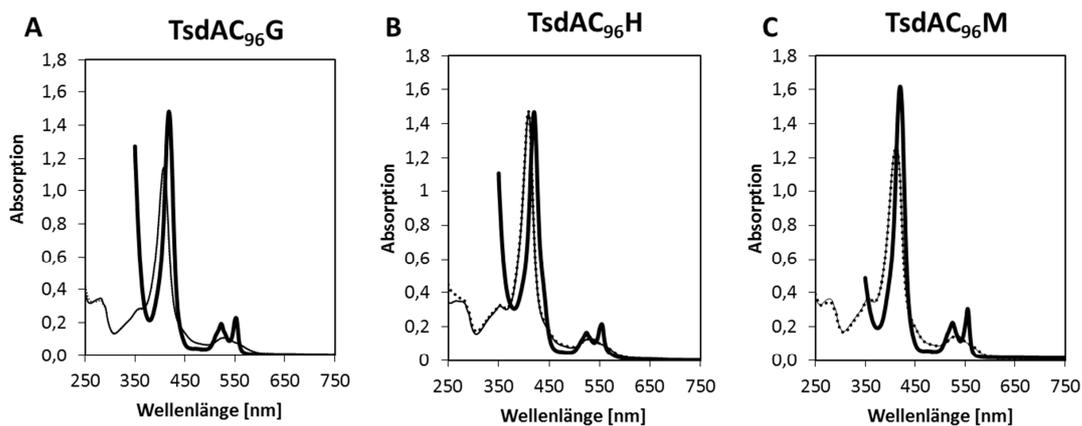


**Abbildung 24:** SDS-PAGE von aufgereinigtem TsdAwt-Protein und TsdA Cysteine<sub>96</sub>-Varianten. A: Häm Färbung von TsdAwt und TsdA Cysteine<sub>96</sub>-Varianten. B: Coomassiefärbung von TsdAwt-Protein und TsdA Cysteine<sub>96</sub>-Varianten. Aufgetragen wurden jeweils 5 µg Protein.

### 3.2.2. Spektroskopische Charakterisierung der TsdA Cysteine<sub>96</sub>-Varianten

Die aufgereinigten TsdA Cysteine<sub>96</sub>-Varianten wurden zunächst spektroskopisch untersucht (2.8.2), da aus dem UV-Vis Spektrum auf Unterschiede in der Häm-Koordination

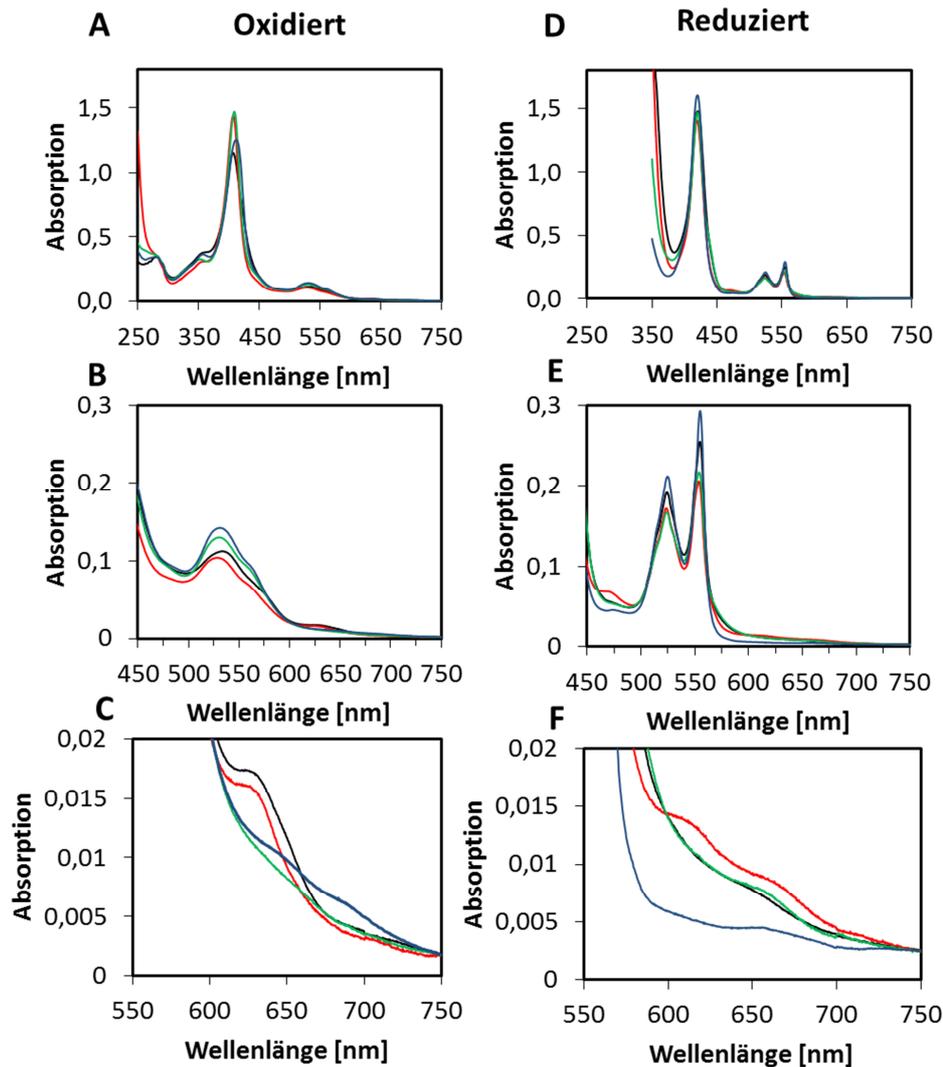
geschlossen werden kann. In Abbildung 25 sind UV-Vis Spektren der TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten, im oxidierten, reduzierten und unbehandelten Zustand, dargestellt. Alle TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten lagen, unbehandelt nach der Aufreinigung, im oxidierten Zustand vor (Abbildung 25). Damit unterscheiden sich die TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten vom TsdA Wildtyp-Protein, das unmittelbar nach der Aufreinigung teil-reduziert vorlag (Denkmann 2011; Denkmann et al. 2012). Alle TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten weisen ein charakteristisches *c*-Typ Cytochrom Spektrum im oxidierten und reduzierten Zustand auf (Abbildung 25), das mit einer Verschiebung des Soret-Peaks in den langwelligeren Bereich bei Reduktion der Proteine, sowie einer deutlichen Ausprägung eines  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peaks, einhergeht (Lemberg und Barrett 1973). Das Verhältnis von Soret-Peak zu 280 nm Peak lag bei allen rekombinant produzierten TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten bei einem Faktor von ungefähr vier und damit vergleichbar mit dem Quotienten, der für das TsdA Wildtyp-Protein errechnet wurde (Tabelle 13 und Abbildung 25).



**Abbildung 25:** Vergleich von UV-Vis Absorptionsspektren der *A. vinosum* TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten. Vollständige Spektren von 250 nm – 750 nm von rekombinantem TsdAC<sub>96</sub>G (125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 4.5  $\mu\text{M}$ ; Abbildung A), TsdAC<sub>96</sub>H (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 3.6  $\mu\text{M}$ ; Abbildung B) und TsdAC<sub>96</sub>M (120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 4.3  $\mu\text{M}$ ; Abbildung C) wurden im frisch aufgereinigten- (dünne Linie), oxidierten- (gepunktete Linie) und reduzierten Zustand (dicke Linie) aufgenommen. Durch die Addition von 3,5  $\mu\text{M}$  Ferricyanid oder 10 mM Natriumdithionit wurde eine Oxidation bzw. Reduktion der Proteine erreicht. Alle Spektren wurden in 50 mM BisTris-HCl Puffer pH 6,5 aufgenommen.

In Abbildung 26 sind vergleichende UV-Vis Spektren des TsdA Wildtyp-Proteins und der TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten dargestellt. Im UV-Vis Spektrum war im oxidierten Zustand bei den verschiedenen TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten eine unterschiedliche Intensität des Soret-Peaks zu erkennen (Abbildung 25 A und D). Während beim TsdA Wildtyp-Protein die Absorptionsintensität des Soret-Peaks im Spektrum des oxidierten Proteins bei einer Wellenlänge von 407 nm 1,15 betrug, war die Absorptionsintensität im Spektrum des TsdAC<sub>96</sub>G Proteins mit 1,43 etwas höher. In Spektren der TsdA Cystein<sub>96</sub>-

Varianten TsdAC<sub>96</sub>H und TsdAC<sub>96</sub>M unterschied sich nicht nur die Intensität des Soret-Peaks mit 1,43 bzw. 1,25 sondern auch die Wellenlänge des Absorptionsmaximums mit 409 nm im UV-Vis Spektrum der oxidierten TsdAC<sub>96</sub>H-Variante und 411,4 nm im UV-Vis Spektrum der oxidierten TsdAC<sub>96</sub>M-Variante (Tabelle 14). Außerdem wurden in den UV-Vis Spektren der oxidierten Proteine noch leichte Unterschiede im Absorptionsmaximum des  $\delta$ -Peaks festgestellt (Tabelle 14), der aber keine Unterschiede in seiner Intensität in Spektren der verschiedenen TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten und des TsdA Wildtyp-Proteins aufwies. Der  $\delta$ -Peak im Spektrum des oxidierten TsdA Wildtyp-Proteins hatte sein Absorptionsmaximum bei 357,4 nm (bei pH 6,5), während in UV-Vis Spektren von TsdAC<sub>96</sub>G und TsdAC<sub>96</sub>H der  $\delta$ -Peak sein Absorptionsmaximum schon bei 352,8 nm erreichte (Tabelle 14). In UV-Vis Spektren der reduzierten Proteine unterschied sich die Wellenlänge des Absorptionsmaximums des Soret-Peaks zwischen den verschiedenen AvTsdA-Varianten nur minimal, jedoch konnten deutliche Unterschiede in der Absorptionsintensität festgestellt werden (Abbildung 26). Der Soret-Peak hatte in den Spektren der Proteine TsdAwt, TsdAC<sub>96</sub>G und TsdAC<sub>96</sub>H ähnliche maximale Absorptionsintensitäten mit 1,47; 1,40 und 1,47, aber im Spektrum der TsdA Cystein<sub>96</sub>-Variante TsdAC<sub>96</sub>M eine deutlich höhere maximale Absorptionsintensität von 1,6 (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Vergleich von UV-Vis Absorptionsspektren für *A. vinosum* TsdAwT und TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten. UV-Vis Spektren von rekombinantem TsdAwT (250 µg mL<sup>-1</sup>; 8,9 µM; schwarze Linie) TsdAC<sub>96</sub>G (125 µg mL<sup>-1</sup>; 4,5 µM; rote Linie), TsdAC<sub>96</sub>H (100 µg mL<sup>-1</sup>; 3,6 µM; grüne Linie) und TsdAC<sub>96</sub>M (120 µg mL<sup>-1</sup>; 4,3 µM; blaue Linie) wurden im oxidierten (Abbildung A, B und C) und reduzierten (Abbildung D, E und F) aufgenommen. A und D zeigen komplette Spektren von 250 nm – 750 nm, B und E einen Ausschnitt von 450 nm – 750 nm, C und F einen Ausschnitt von 550 nm – 750 nm. Durch die Addition von 3,5 µM Ferricyanid oder 10 mM Natriumdithionit wurde eine Oxidation bzw. Reduktion der Proteine erreicht. Alle Spektren wurden in 50 mM BisTris-HCl Puffer pH 6,5 aufgenommen.

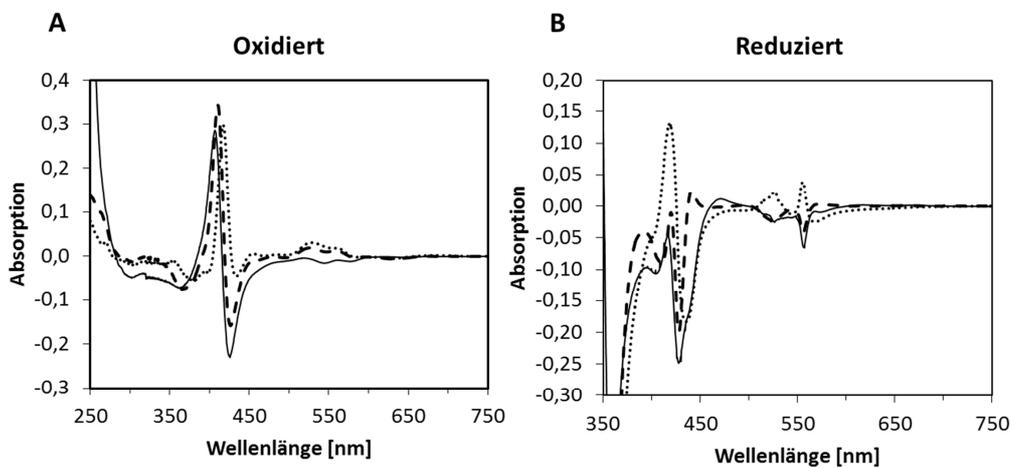
Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima für den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peak zeigten nur minimale Differenzen in den Spektren der TsdA Proteine auf, jedoch unterschied sich auch hier das Spektrum der TsdAC<sub>96</sub>M-Variante von den anderen Proteinen in der Absorptionsintensität (Abbildung 26 E). Das Verhältnis  $E_{\alpha}/E_{\beta}$  war 1,36 für TsdAC<sub>96</sub>M, während TsdAwT einen Quotienten für  $E_{\alpha}/E_{\beta}$  von 1,27 erreichte (Tabelle 14). Im Spektrum von TsdAC<sub>96</sub>G konnte ein zusätzlicher Peak im reduzierten Zustand bei 467,4 nm beobachtet werden (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Spektrale Charakteristika des TsdAwt-Proteins und der TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten**

Protein (pH)	Soret ox.	delta Peak	Soret red.	$\alpha$ -Peak	$\beta$ -Peak	$E_{\text{Soret}}/E_{280\text{nm}}$	$E_{\alpha}/E_{\beta}$	Weitere Peaks (Ladungstransfer)
TsdAwt (pH 6.5)	407,2	357,4	419,8	554,6	524,0	3,335	1,27	634 nm (ox)
TsdACys <sub>96</sub> Gly (pH 6.5)	407,0	352,8	419,2	553,6	523,4	4,061	1,20	629,4 nm (ox); 467,4 nm (red)
TsdACys <sub>96</sub> His (pH 6.5)	409,0	352,8	420,2	554,0	524,0	4,083	1,30	660 nm (red)
TsdACys <sub>96</sub> Met (pH 6.5)	411,4	358,8	419,8	555,0	524,6	4,280	1,36	660 nm (red)

(ox): Peak tritt nur im oxidierten Zustand des Proteins auf; (red): Peak tritt nur im reduzierten Zustand des Proteins auf

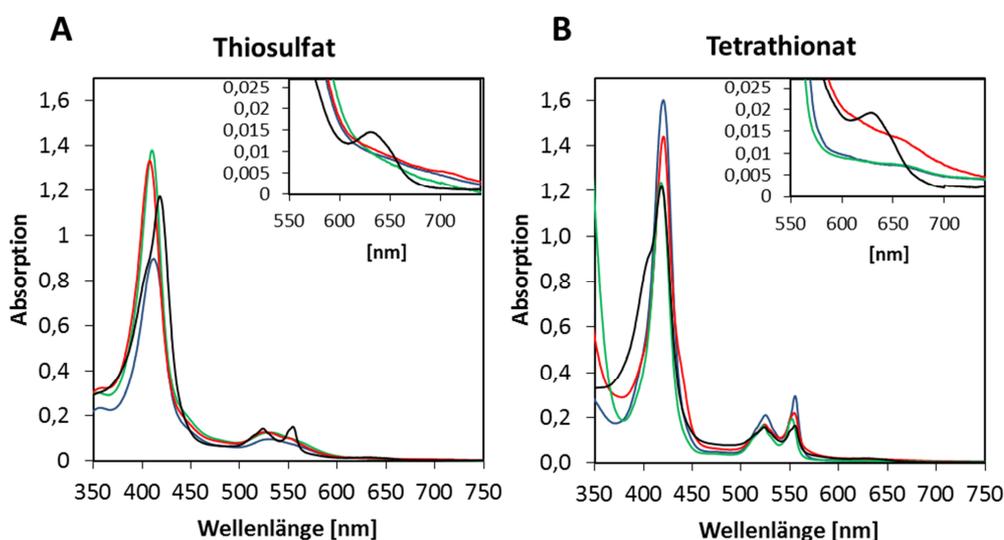
Weitere Absorptionsmaxima im langwelligen Bereich oberhalb von 600 nm konnten in Spektren aller Proteine detektiert werden. Das Auftreten eines Peaks in Spektren des oxidierten und teil-reduzierten TsdA Wildtyp-Proteins wurde bereits ausführlich dargelegt (Tabelle 14 und 3.1.3). Für die TsdAC<sub>96</sub>G-Variante konnte ein Peak bei 629,5 nm im oxidierten Zustand festgestellt werden. Ein Peak bei 660 nm im reduzierten UV-Vis Spektrum konnte für die beiden TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten TsdAC<sub>96</sub>H und TsdAC<sub>96</sub>M beobachtet werden und im Spektrum des reduzierten TsdAC<sub>96</sub>G konnten gleich zwei Absorptionsmaxima, bei 630 nm und 660 nm, detektiert werden (Tabelle 14 und Abbildung 26 C und F).



**Abbildung 27:** Differenzspektren bei denen vom TsdA Wildtyp-Protein Spektrum das Spektrum von TsdAC<sub>96</sub>G (dünne Linie), TsdAK<sub>96</sub>M (gepunktete Linie) oder TsdAC<sub>96</sub>H (gestrichelte Linie) im oxidierten (Abbildung A) oder reduzierten (Abbildung B) Zustand abgezogen wurde.

In Abbildung 27 sind Differenzspektren der TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten, bei denen jeweils Spektren des oxidierten oder reduzierten Proteins, vom Spektrum des TsdA Wildtyp-Proteins abgezogen wurde dargestellt. In den Spektren wird deutlich, dass Veränderungen der spektralen Charakteristika der oxidierten Proteine hauptsächlich im Bereich des Soret-Peaks stattfinden (Abbildung 27 A). Alle TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten weisen eine Ver-

schiebung des Soret-Peaks in den langwelligeren Bereich auf. Weniger starke Abweichungen vom Spektrum des oxidierten TsdAwT sind aber auch im Bereich der  $\alpha/\beta$ -Schulter zu beobachten (Abbildung 27 A). In den Differenzspektren der reduzierten Proteine sind auch vor allem Veränderungen im Bereich des Soret-Peaks zu erkennen, bei der TsdAC<sub>96</sub>M-Variante fallen diese besonders deutlich auf (Abbildung 27 B). Charakteristische Veränderungen im Bereich des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peaks äußern sich für diese Variante durch eine positive Abweichung und demnach eine gesteigerte Absorptionsintensität, während für die TsdA-Varianten TsdAC<sub>96</sub>G und TsdAC<sub>96</sub>H eine negative Abweichung im Differenzspektrum zu erkennen ist, welche auf eine Verminderung der Intensität in diesem Bereich des Spektrums schließen lässt (Abbildung 27 B).



**Abbildung 28:** Vergleich von UV-Vis Absorptionsspektren von TsdA Wildtyp-Protein und TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten nach der Zugabe von Thiosulfat oder Tetrathionat. Vergleich von UV-Vis Spektren nach der Zugabe von 8 mM Thiosulfat (Abbildung A) oder 10 mM Tetrathionat (Abbildung B) zu oxidiertem TsdA Wildtyp-Protein (250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 8.9  $\mu\text{M}$ ; schwarze Linie), TsdAC<sub>96</sub>G (125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 4.5  $\mu\text{M}$ ; rote Linie), TsdAC<sub>96</sub>H (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 3.6  $\mu\text{M}$ ; grüne Linie) und TsdAC<sub>96</sub>M (120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 4.3  $\mu\text{M}$ ; blaue Linie). Der Bereich von 550 – 750 nm wurde jeweils vergrößert dargestellt. Oxidation wurde durch die Addition von 3,5  $\mu\text{M}$  Ferricyanid, Reduktion durch die Addition von 10 mM Natriumdithionit erreicht. Alle Spektren wurden in 100 mM BisTris-HCl Puffer pH 6,5 aufgenommen.

Nur beim TsdA Wildtyp-Protein konnte durch die Addition von Thiosulfat eine Teilreduktion des Proteins beobachtet werden. In Abbildung 28 sind vergleichende UV-Vis Spektren des TsdA Wildtyp-Proteins und aller TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten nach der Addition von Thiosulfat oder Tetrathionat dargestellt. Alle TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten verblieben nach der schrittweisen Zugabe von Thiosulfat bis zu einer Konzentration von 8 mM weiterhin im oxidierten Zustand (Abbildung 28). Nach der Zugabe von Tetrathionat zu Proben von reduzierten TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten konnte keine Oxidation der Proteine im UV-Vis Spektrum beobachtet werden. Auch hier wurde nur beim TsdA Wildtyp-

Protein eine Teiloxidation des Proteins, sichtbar über eine Teilverschiebung des Soret-Peaks in den kurzwelligeren Bereich, detektiert (Abbildung 28). Die Beobachtungen für das TsdA Wildtyp-Protein decken sich mit Ergebnissen zur Untersuchung der katalytischen Aktivität des Proteins (3.1.4).

### 3.2.3. Kinetische Charakterisierung der TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten

Bereits in der Diplomarbeit (Denkmann 2011) konnten spezifische Aktivitäten für die Thiosulfat-abhängige Reduktion von Ferricyanid für die TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten TsdAC<sub>96</sub>G und TsdAC<sub>96</sub>H bestimmt werden. Dabei wurde festgestellt, dass diese Proteine katalytisch inaktiv sind, jedoch konnte noch keine eindeutige Aussage zur spezifischen Aktivität gemacht werden solange die Proben durch proteolytische Abbauprodukte verunreinigt waren (Denkmann 2011). Nachdem eine effiziente und effektive Abtrennung von Abbauprodukten etabliert werden konnte (3.2.1), wurde erneut die katalytische Aktivität der Enzyme bestimmt. Alle TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten waren weder in der Lage Thiosulfat zu oxidieren noch Tetrathionat zu reduzieren. Die Aminosäure Cystein<sub>96</sub> ist essentiell für die katalytische Aktivität der Thiosulfatdehydrogenase (Denkmann et al. 2012).

### 3.3. AvTsdA Lysin<sub>208</sub>- und Methionin<sub>209</sub>-Varianten

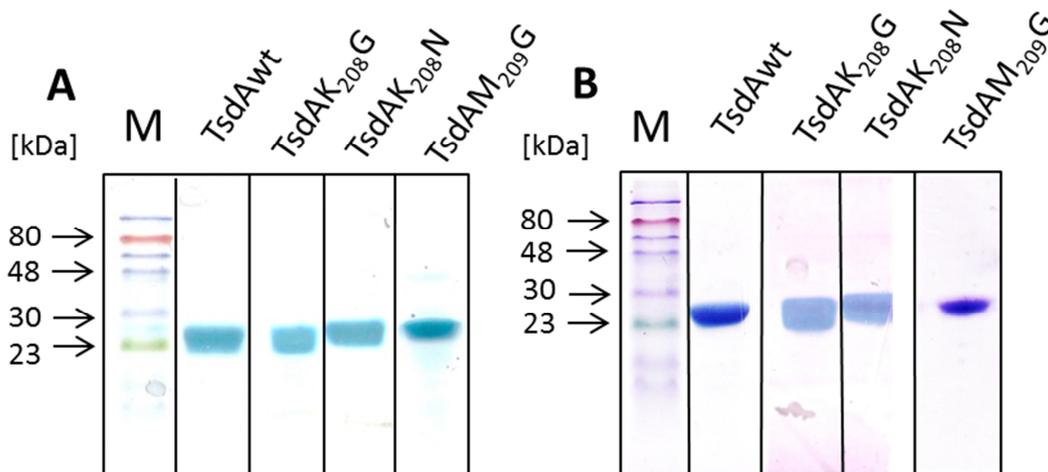
In einem nächsten Schritt sollten die biochemischen Eigenschaften sowie die Funktion von Häm 2 untersucht werden. Die beiden Aminosäuren Histidin<sub>164</sub>/Lysin<sub>208</sub> koordinieren das Häm 2 im oxidierten, die Aminosäuren Histidin<sub>164</sub>/Methionin<sub>209</sub> koordinieren das Häm 2 im reduzierten Zustand (3.1.1). Drei Varianten wurden von TsdA erstellt, in denen Lysin<sub>208</sub> oder Methionin<sub>209</sub> durch Glycin (TsdAK<sub>208</sub>G und TsdAM<sub>209</sub>G) oder Asparagin (TsdAK<sub>208</sub>N) ausgetauscht wurde. Die Asparagin-Variante wurde zusätzlich gewählt, da in *tsdA*-homologen Genen in vielen Fällen ein Asparagin direkt vor dem hoch konservierten Methionin in der Aminosäuresequenz auftritt wie aus einem Alignment von TsdA-Proteinen aus verschiedenen Organismen hervorgeht, dargestellt in Abbildung 29.

<i>A. vinosum</i>	201	ADGR---LFPPLWGRSFNFTGAGMNRQATAAGFIKHKM	MPLGADDSLSDEEAWDVAGFVLT	258
<i>C. jejuni</i>	231	DSAGAYLYPPLWGDDSYNTGAGMYRLIKAASYIKENM	PQGAPD-SLEDAYDVAAYMNSQ	281
<i>C. metallidurans</i>	191	POGG---VFPPVWGKDSFNIGAGMARMYTAAAFVKHN	MPLGOGGTLQAODALDVSAYFTA	249
<i>S. lithotrophus</i>	199	VDGK---IFPPLWGSSEFNWAGMHRINTAAAFIKANM	PLSKGGTLTQEAWDVATFVMS	256
<i>T. intermedia</i>	201	VNGE---VFPPPLWGPKEFNWAGMGSYKNAAKFIYAN	MPYGMYSLSLQEAWDVAYFMDA	369

**Abbildung 29:** Alignment von TsdA-Homologen Sequenzen aus *Allochrochromatium vinosum* (Alvin\_0091), *Campylobacter jejuni* (C8j\_0815), *Cupravidus metallidurans* (Rmet\_5347), *Sideroxydans lithotrophus* (Slit\_1878) und *Thiomonas intermedia* (Tint\_2892). Schwarz markiert ist das hoch konservierte Methionin, eingerahmt die sich davor befindende Aminosäure. Die Gennummern beziehen sich auf die Datenbank KEGG (Tabelle 5).

### 3.3.1. Klonierung und Produktion der TsdA Lysin<sub>208</sub>- und TsdA Methionin<sub>209</sub>-Varianten

Die TsdA-Varianten TsdAK<sub>208</sub>G, TsdAK<sub>208</sub>N und TsdAM<sub>209</sub>G wurden über die Expressionsplasmide pPR-IBAtdAsLys208Glystrep, pPR-IBAtdAsLys208Asnstrep und pPR-IBAtdAsMet209Glystrep (Tabelle 10) produziert und wie die Expressionsplasmide der TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten mittels GeneSOEING erstellt (2.3.2, 3.2.1).



**Abbildung 30:** SDS-PAGE mit aufgereinigtem TsdAwt-Protein und TsdA Lysin<sub>208</sub>/Methionin<sub>209</sub>-Varianten. A: Häm Färbung von TsdAwt und TsdA Lysin<sub>208</sub>/Methionin<sub>209</sub>-Varianten. B: Coomassiefärbung des TsdAwt-Proteins, TsdA Lysin<sub>208</sub>- und Methionin<sub>209</sub>-Varianten. TsdAwt, TsdAK<sub>208</sub>G, TsdAK<sub>208</sub>N: 5 µg Protein; TsdAM<sub>209</sub>G: 3.8 µg Protein.

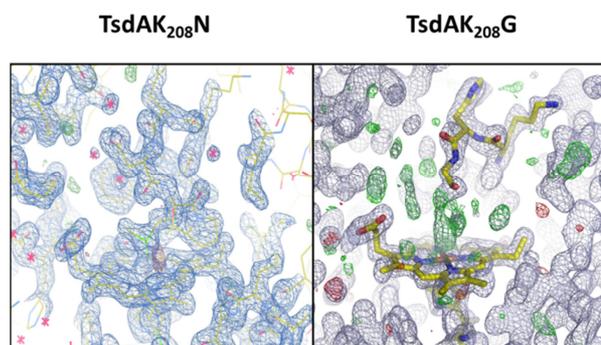
In Abbildung 30 ist eine Häm- und Coomassiefärbung der aufgereinigten TsdA-Varianten dargestellt, alle Proteine konnten kontaminationsfrei produziert werden. Die Ausbeute für TsdAK<sub>208</sub>G betrug 521 µg/L *E. coli*-Kultur, für TsdAK<sub>208</sub>N 1071 µg/L *E. coli*-Kultur und für TsdAM<sub>209</sub>G 1560 µg/L *E. coli*-Kultur. Die vergleichsweise geringe Ausbeute für TsdAK<sub>208</sub>G erklärt sich durch einen hohen Anteil an proteolytischen Abbauprodukten, welche während der Gelfiltration abgetrennt werden konnten. Der Reinheitsgrad der Proteine  $E_{\text{Soret}}/E_{280\text{nm}}$  betrug 2,7 für die beiden TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten und 3,1 für TsdAM<sub>209</sub>G. Die Reinheit ist im Vergleich zum TsdA Wildtyp-Protein etwas vermindert (TsdA Wildtyp-Protein: 3,3; Tabelle 13).

### 3.3.2. Struktur der TsdA-Varianten TsdAK<sub>208</sub>G und TsdAK<sub>208</sub>N

Über die Sitting-drop Methode konnten Kristalle von den beiden TsdA-Varianten TsdAK<sub>208</sub>G (2,5 mg/mL) und TsdAK<sub>208</sub>N (4 mg/mL) erhalten werden. Die Erstellung von Kristallen und Kristallstrukturen wurde von Dr. José Brito im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Margarida Archer (ITQB, Oeiras; Portugal) durchgeführt.

Für TsdAK<sub>208</sub>N wurde 20,5 % PEG 3350, 100 mM BisTris pH 5,85, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 100 mM NaI als Fällungsmittel verwendet und der finale Kristall enthielt 25,2 % PEG 3350, 95 mM BisTris pH 5,85, 190 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, und 5 % PEG 400. Für TsdAK<sub>208</sub>G wurde 27,5 % PEG 3350, 100 mM BisTris pH 7,15, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 100 mM NaI als Fällungsmittel verwendet, der finale Kristall enthielt 25,2 % PEG 3350, 95 mM BisTris pH 6,72, 190 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, und 5 % PEG 400. Von beiden Kristallen konnte die Struktur mittels Röntgendiffraktometrie am I02 Beamline Synchrotron in Diamond (Großbritannien) aufgeklärt werden.

Die Kristalle zeigen die Struktur der beiden Proteine im oxidierten Zustand. Der überwiegende Teil der Kristallstruktur war deckungsgleich mit der Struktur, die für das TsdA Wildtyp-Protein gewonnen werden konnte. Eine Ausnahme bildeten die Umgebung von Häm 2 und der Ligand dieses Cofaktors.



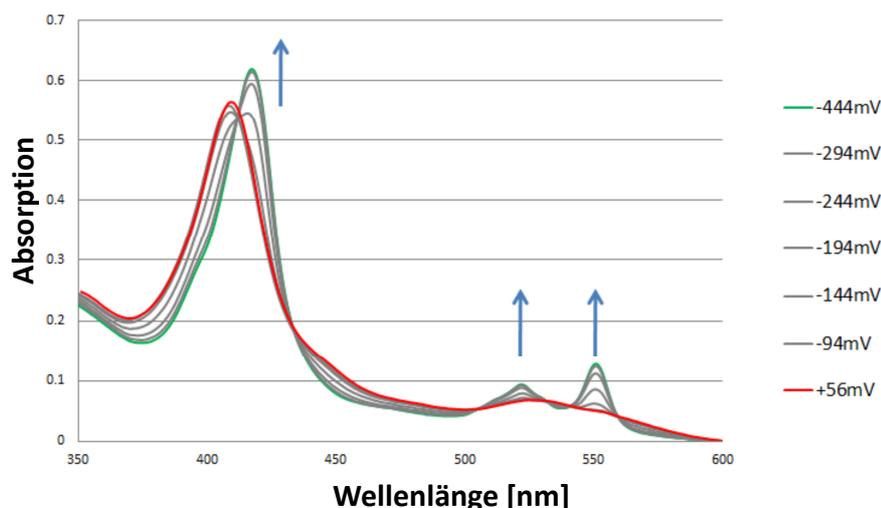
**Abbildung 31:** Darstellung der Struktur der Umgebung von Häm 2 über die Elektronendichte. Die linke Abbildung zeigt die Umgebung von Häm 2 in TsdAK<sub>208</sub>N, die rechte Abbildung die Umgebung von Häm 2 in TsdAK<sub>208</sub>G.

In Abbildung 31 ist jeweils die Umgebung und -Koordination von Häm 2 der beiden Proteine dargestellt. Das Häm 2 der TsdAK<sub>208</sub>N-Variante, wird durch Histidin<sub>164</sub> und Methionin<sub>209</sub> koordiniert. Diese Koordination entspricht der Koordination, des Häm 2 des TsdA Wildtyp-Proteins im reduzierten Zustand. Das Asparagin ersetzt nicht das Lysin in der Rolle des Häm-Eisen Liganden sondern überlässt diese Funktion dem Methionin<sub>209</sub>.

Häm 2 der TsdA K<sub>209</sub>G-Variante, konnte keine Koordination zugeordnet werden. Ein distaler Ligand für Häm 2 konnte anhand der bisher gewonnen Daten noch nicht ausgemacht werden. Die Aminosäure Glycin kann nicht als distaler Ligand des Hämes fungieren, dennoch konnte die Aminosäure Methionin<sub>209</sub> nicht klar als axialer distaler Ligand des Hämes identifiziert werden. Eventuell liegt Häm 2 hier pentakoordiniert im „high-spin“ Status vor.

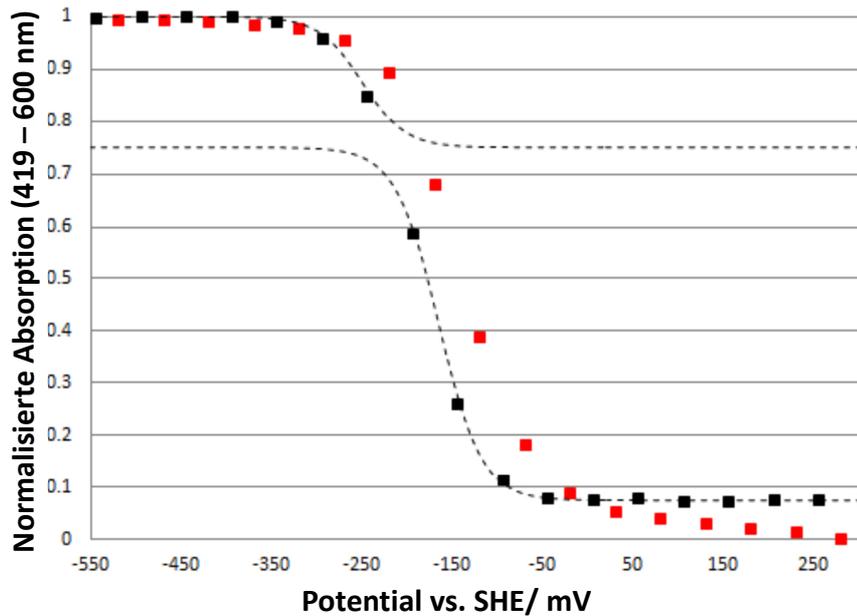
### 3.3.3. Bestimmung des Redoxpotentials von TsdAK<sub>208</sub>G

Um den Vorgang der Hysterese genauer charakterisieren zu können und die Redoxpotentiale den einzelnen Hämen besser zuordnen zu können wurde das Redoxpotential der TsdA Lysin<sub>208</sub>-Variante TsdAK<sub>208</sub>G bestimmt. Das Redoxpotential von TsdAK<sub>208</sub>G wurde von Sam Rowe im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Julea Butt (Norwich, UK) bestimmt. TsdAK<sub>208</sub>G wurde produziert, konzentriert (10  $\mu$ M) und eine Bestimmung des Redoxpotentials über eine Zinnoxid-Elektrode, die Spannungen von einem Potentiostat auf die Proteinprobe übertrug, durchgeführt (2.8.12).



**Abbildung 32:** Absorptionsspektren von TsdAK<sub>208</sub>G bei verschiedenen angelegten Potentialen. In rot ist das oxidierte Spektrum und in grün das komplett reduzierte Spektrum dargestellt. Die blauen Pfeile zeigen starke Veränderungen der Absorptionsmaxima an. 50  $\mu$ M TsdA Lysin<sub>208</sub>Glycin Protein wurden mit 2 mM Neomycin versetzt. 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 2 mM Neomycin pH 7,0 diente als Puffer. Die Spannungswerte beziehen sich auf die Standard-Wasserstoff-Elektrode (SHE). Modifizierte Abbildung von Sam Rowe.

In Abbildung 32 sind Absorptionsspektren von TsdAK<sub>208</sub>G bei verschiedenen angelegten Spannungen zu erkennen. Bei einer Spannung von + 56 mV befand sich das Protein im komplett oxidierten Zustand und konnte mit einer schrittweisen Verringerung auf – 444 mV in den vollständig reduzierten Zustand gebracht werden. Anhand der aufgenommenen UV-Vis Spektren konnte die Höhe des Soret-Peaks, des  $\alpha$ - und des  $\beta$ -Peaks bestimmt werden. Die Peakhöhe im vollständig oxidierten Zustand wurde 0 und im vollständig reduzierten Zustand 1 gesetzt. Über die Nernst-Gleichung konnte eine Simulation erstellt werden, aus der sich Potentiale für beide Häme ableiten lassen.



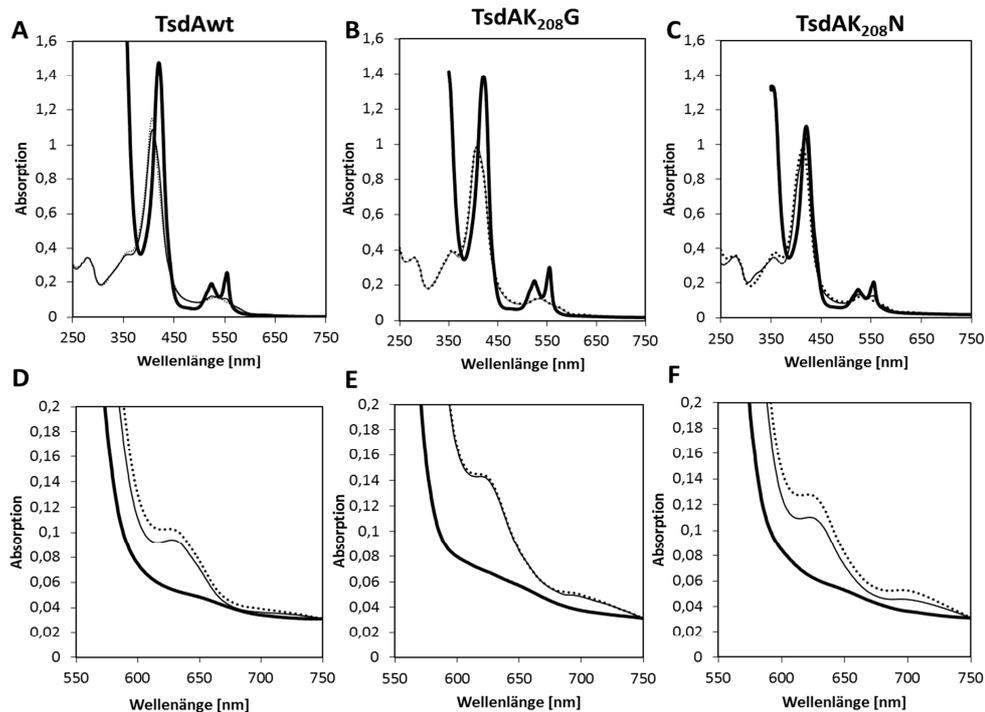
**Abbildung 33:** Reduktion und Reoxidation von TsdAK<sub>208</sub>G dargestellt über die Änderung der Absorption bei 419 nm relativ zu der bei 600 nm gegen die angelegte Spannung. Zur Erstellung der Simulation mittels der Nernst-Gleichung (gestrichelte Linien) wurde die kleinste Zahl 0 (vollständig oxidiertes Zustand), die höchste Zahl 1 gesetzt (vollständig reduzierter Zustand). Schwarze Rauten stellen die Reduktion, rote Rauten die Reoxidation des Proteins dar. Modifizierte Abbildung von Sam Rowe.

Die Reduktion und Reoxidation von TsdAK<sub>208</sub>G wurde in Abbildung 33 dargestellt. Im Gegensatz zum TsdA Wildtyp-Protein liegen die Werte der normalisierten Absorption für die Reduktion und Reoxidation des Proteins nahezu übereinander, was eine Hysterese des Proteins ausschließt. Der Ligandenwechsel von einer His/Lys- zu einer His/Met-Koordination an Häm 2 kann durch den Austausch des Lysins durch Glycin nicht mehr stattfinden. Über das mittlere Potential der Kurven konnten ungefähre Werte für das Redoxpotential der beiden Häme ermittelt werden. Die Häme haben hiernach ein Redoxpotential von – 165 mV und - 250 mV. Ein positives Potential für eines der Häme, wie für das TsdA Wildtyp-Protein festgestellt, konnte nicht mehr ermittelt werden. Der Austausch der Aminosäure Lysin führt damit zu einem drastischen Absinken des Redoxpotentials an Häm 2.

#### 3.3.4. Spektroskopische Analyse der TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten

Ein Austausch der Aminosäure Lysin<sub>208</sub> im TsdA-Protein führte zu veränderten spektralen Charakteristika des Proteins. In Abbildung 34 sind UV-Vis Spektren der beiden TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten im Vergleich zum TsdA Wildtyp-Protein dargestellt. Eine unterschiedliche Absorptionsintensität des Soret-Peaks in Spektren der verschiedenen Proteine konnte sowohl im oxidierten -, als auch im reduzierten Zustand, in dem die TsdA K<sub>208</sub>N-Variante eine deutlich verminderte Intensität im Vergleich zu den beiden anderen Proteinen aufweist, festgestellt werden. Der Soret-Peak in Spektren von TsdAwt-Protein und

TsdAK<sub>208</sub>G hatte Absorptionsmaxima im oxidierten Zustand der Proteine bei 1,15 und im reduzierten Zustand bei 1,47 beziehungsweise 1,37 während die Absorptionsmaxima des Soret-Peaks in Spektren der TsdAK<sub>208</sub>N-Variante hier nur eine Intensität von 0,9 im oxidierten Zustand und 1,09 im reduzierten Zustand aufwiesen (Abbildung 34 A, B und C). In dem Spektrum der oxidierten TsdAK<sub>208</sub>N-Variante wurde zudem eine starke Verschiebung des Soret-Peaks im Vergleich zum TsdA Wildtyp-Protein in den langwelligeren Bereich detektiert. Der  $\gamma$ -Peak hatte sein Absorptionsmaximum bei 407,2 nm im Spektrum des oxidierten TsdA Wildtyp-Protein und bei 413,4 nm in dem Spektrum der oxidierten TsdAK<sub>208</sub>N-Variante (Abbildung 34; Tabelle 15). Die Intensität von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peak waren im UV-Vis Spektrum von reduziertem TsdAK<sub>208</sub>N deutlich vermindert im Vergleich zu Spektren des Wildtyp Proteins oder der TsdAK<sub>208</sub>G-Variante, aber die Absorptionsmaxima beider Peaks waren für alle drei Proteine identisch (Abbildung 34; Tabelle 15). Für das Protein TsdAK<sub>208</sub>G konnte zudem eine Änderung des Quotienten der Absorptionsintensitäten von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peak von 1,27 (TsdA Wildtyp-Protein und TsdAK<sub>208</sub>N-Variante) zu 1,35 festgestellt werden (Tabelle 15).



**Abbildung 34:** AvTsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten. Komplette Spektren von rekombinantem TsdA Wildtyp-Protein (160  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 5.7  $\mu\text{M}$ ; A), TsdAK<sub>208</sub>G (224.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 8.3  $\mu\text{M}$ ; B) und TsdAK<sub>208</sub>N (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 7.4  $\mu\text{M}$ ; C) wurden im aufgereinigten (dünne Linie), oxidierten (gepunktete Linie) und reduzierten (dicke Linie) aufgenommen. Eine Oxidation wurde durch die Addition von 7  $\mu\text{M}$  Ferricyanid und Reduktion durch die Addition von 10 mM Natriumdithionit erreicht. Ausschnitte der Spektren von 550 nm – 750 nm des TsdA Wildtyp-Proteins (1150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 41.1  $\mu\text{M}$ ), TsdAK<sub>208</sub>G (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 37  $\mu\text{M}$ ; E) und TsdAK<sub>208</sub>N (1123  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 41.6  $\mu\text{M}$ ) sind in D, E und F dargestellt. Alle Spektren wurden in 50 mM BisTris-HCl Puffer, pH 6.5 aufgenommen.

Im langwelligeren Bereich ab 600 nm konnten bei beiden TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten zusätzliche Absorptionsmaxima detektiert werden. Während in Spektren des oxidierten und teil-reduzierten TsdA Wildtyp-Proteins ein Maximum bei 634 nm beobachtet werden konnte, konnten für die beiden TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten Maxima bei 620 nm (TsdAK<sub>208</sub>N) und 620,8 nm (TsdAK<sub>208</sub>G) detektiert werden, (Abbildung 34 D, E und F, Tabelle 15). Damit unterscheiden sich die UV-Vis Spektren dieser Proteine wesentlich von Spektren der TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten TsdAC<sub>96</sub>H und TsdAC<sub>96</sub>M, für welche keine Absorptionsmaxima im oxidierten Zustand oberhalb von 600 nm beobachtet werden konnten (3.2.2). Zusätzlich wiesen Spektren beider TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten ein Absorptionsmaximum bei ca. 695 nm im oxidierten Zustand auf, welches weder in Spektren des Wildtyp Proteins noch für die TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten beobachtet werden konnte (Abbildung 34 D, E und F; Tabelle 15). Das Auftreten dieses Peaks kann eindeutig auf einen Austausch der Aminosäure Lysin zurückgeführt werden.

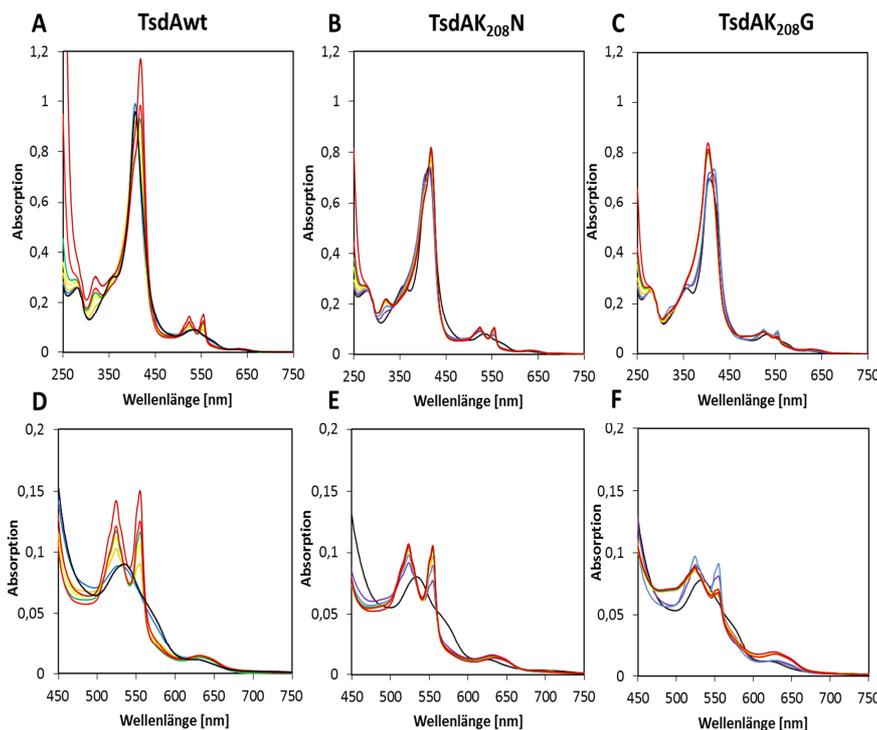
**Tabelle 15: Spektrale Charakteristika von TsdAwt und TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten**

Protein (pH)	Soret ox.	delta Peak	Soret red.	$\alpha$ -Peak	$\beta$ -Peak	$E_{\text{Soret}}/E_{280\text{nm}}$	$E_{\alpha}/E_{\beta}$	Weitere Peaks (Ladungstransfer)
TsdAwt (pH 6.5)	407,2	357,4	419,8	554,6	524	3,335	1,27	634 nm (ox)
TsdAK <sub>208</sub> N (pH 6.5)	413,4	357,6	420,4	554,6	524	2,734	1,27	620 nm; 695 nm (ox)
TsdAK <sub>208</sub> G (pH 6.5)	406,2	357,4	420,4	554,6	524	2,756	1,35	620.8 nm; 696.8 nm (ox)

(ox): Peak tritt nur im oxidierten Zustand des Proteins auf

In Abbildung 35 sind Spektren, nach der Zugabe verschiedener Konzentrationen von Thiosulfat, zu den TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten dargestellt (Abbildung 35). Zwei wesentliche Folgerungen konnten aus den hier dargestellten Spektren abgeleitet werden. Zum einen war die Teilreduktion der Proteine TsdAK<sub>208</sub>N und TsdAK<sub>208</sub>G mit dem Substrat Thiosulfat möglich, was eine katalytische Aktivität vermuten lässt und zum anderen fiel diese Reduktion deutlich vermindert aus im Vergleich zum TsdA Wildtyp-Protein, was auf eine reduzierte Bindung zum Substrat Thiosulfat schließen lässt. Für das TsdA Wildtyp-Protein ist in Abbildung 35 A und D zu erkennen dass der Soret-Peak nach der Addition von 8 mM Thiosulfat eine höhere Absorptionsintensität als auch eine Verschiebung der Wellenlänge aufwies und das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peak nahezu vollständig ausgeprägt waren. Im Vergleich dazu konnte nach der Zugabe von 8 mM Thiosulfat nicht annähernd eine Intensität wie im reduzierten Zustand für die TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten erreicht werden. Besonders deutlich wurde dies in Spektren des TsdAK<sub>208</sub>G Protein, wo der Soret-Peak eine Absorptionsintensität von 1,37 im reduzierten Zustand und gerade einmal 0,8 nach einer

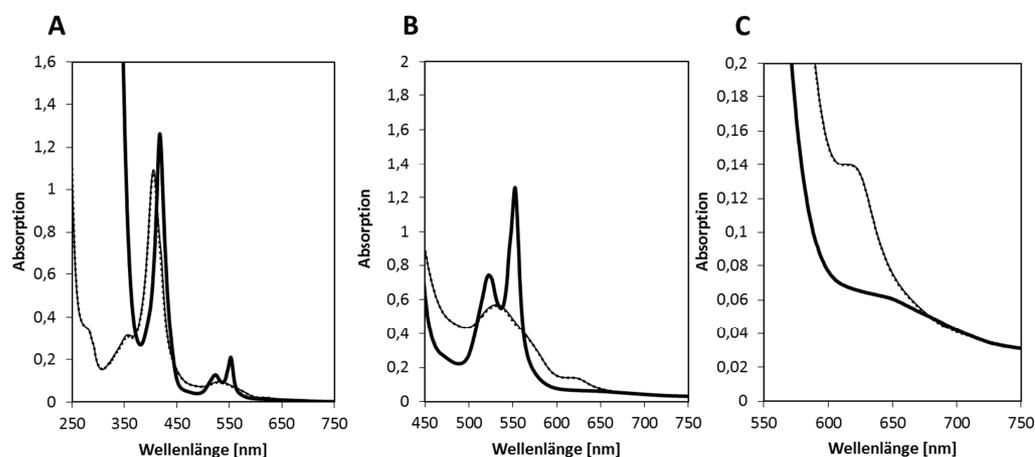
Addition von Thiosulfat erreichte (Abbildung 35 B). Zudem war nach der Zugabe von Thiosulfat in Spektren beider TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten der  $\beta$ -Peak noch stärker ausgeprägt als der  $\alpha$ -Peak, was nur auf eine Teilreduktion dieser Proteine schließen lässt (Abbildung 35 E und F). Interessanterweise verlieren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peak in Spektren der TsdAK<sub>208</sub>G-Variante schon ab einer Zugabe von 2 mM Thiosulfat wieder an Intensität. Das Absorptionsmaximum bei 620 nm gewann nach Inkubation mit Thiosulfat in Spektren beider TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten an Intensität (Abbildung 35 E und F). Vergleichbares wurde auch schon in Spektren des TsdA Wildtyp-Proteins für das Absorptionsmaximum bei 634 nm beobachtet (Abbildung 20). Eine Zugabe des Substrates Tetrathionat zu vorher reduzierten Proteinen TsdAK<sub>208</sub>N und TsdAK<sub>208</sub>G bewirkte bei Konzentrationen bis 100 mM keine Veränderung der spektralen Charakteristika (nicht dargestellt). Vermutlich zerfällt ein Großteil des Tetrathionates in Anwesenheit von Natriumdithionit, weshalb diese Versuche noch keine Aussage über die katalytische Aktivität der Proteine für die Tetrathionat-Reduktion ermöglichen.



**Abbildung 35:** Vergleich von UV-Vis Absorptionsspektren für *A. vinosum* TsdA Wildtyp und TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten nach der Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an Thiosulfat. Komplette Spektren von rekombinantem TsdA Wildtyp (160  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 5.7  $\mu\text{M}$ ; A), TsdAK<sub>208</sub>G (224.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 8.3  $\mu\text{M}$ ; B) und TsdAK<sub>208</sub>N (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 7.4  $\mu\text{M}$ ; C) wurden im oxidierten Zustand (schwarz) und nach der Addition von 20  $\mu\text{M}$  (lila), 100  $\mu\text{M}$  (hellblau), 200  $\mu\text{M}$  (orange), 500  $\mu\text{M}$  (gelb), 1 mM (grün), 2 mM (rot) oder 8 mM (dunkelrot) Thiosulfat aufgenommen. Spektren von 550 nm – 750 nm wurden von hoch konzentrierten Proteinlösungen aufgenommen: TsdA Wildtyp-Protein (1150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 41.1  $\mu\text{M}$ ; D), TsdAK<sub>208</sub>G (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 37  $\mu\text{M}$ ; E) und TsdAK<sub>208</sub>N (1123  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 41.6  $\mu\text{M}$ ; F). Alle Spektren wurden in 50 mM BisTris-HCl Puffer, pH 6.5 aufgenommen. Oxidation wurde durch die Addition von 3,5  $\mu\text{M}$  (komplette Spektren) oder 7  $\mu\text{M}$  (Ausschnitte) Ferricyanid erreicht.

### 3.3.5. Spektroskopische Analyse von TsdAM<sub>209</sub>G

Für die TsdA-Variante TsdAM<sub>209</sub>G wurden vor allem Änderungen der spektralen Charakteristika im reduzierten Zustand erwartet, da nur hier das Methionin<sub>209</sub> eine Rolle als Ligand von Häm 2 spielt. Dennoch konnten auch Unterschiede für das UV-Vis Spektrum des oxidierten Proteins im Vergleich zum TsdA Wildtyp-Protein festgestellt werden. In Abbildung 36 sind UV-Vis Spektren der oxidierten, reduzierten und unbehandelten TsdA Methionin<sub>209</sub>-Variante dargestellt. Der Soret-Peak absorbierte im Spektrum des oxidierten TsdAM<sub>209</sub>G Proteins schon bei 404,8 nm und auch das Absorptionsmaximum des  $\delta$ -Peaks war in den kurzwelligeren Bereich zu einer Wellenlänge von 351 nm verschoben (Abbildung 36 A;). Im Spektrum des reduzierten TsdAM<sub>209</sub>G war der Soret-Peak im Vergleich zum TsdA Wildtyp Spektrum von 419,8 nm zu 417,2 nm verschoben und sowohl der  $\alpha$ - als auch der  $\beta$ -Peak waren um wenige Nanometer von 554,6 nm zu 552,6 nm und von 524 nm zu 523,2 in den kurzwelligeren Bereich in ihren Absorptionsmaxima verändert (Abbildung 36 A und B). Deutlich verändert war der Intensitätsunterschied  $E_\alpha/E_\beta$ , der 1,64 betrug (TsdA Wildtyp-Protein: 1,27), was auf eine starke Veränderung der Intensität des  $\alpha$ -Peaks zurückgeführt werden konnte (Abbildung 36 B).

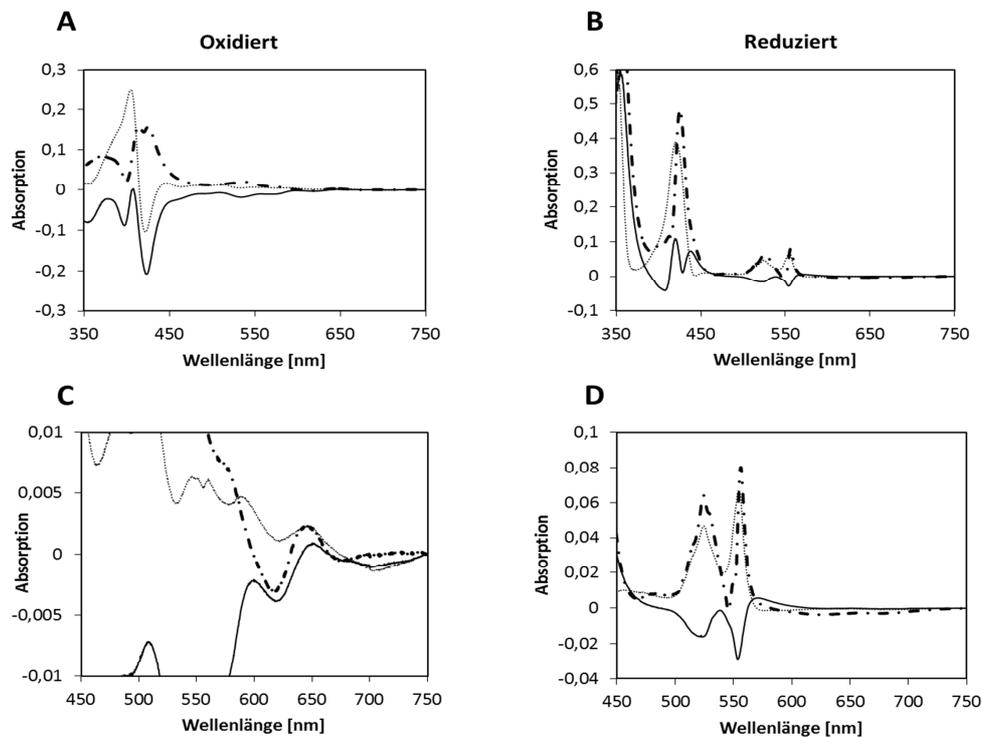


**Abbildung 36:** UV-Vis Spektren von TsdAM<sub>209</sub>G. A: Komplette UV-Vis Spektren von TsdAM<sub>209</sub>G (218  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 8,1  $\mu\text{M}$ ) im oxidierten (gepunktete Linie), frisch aufgereinigtem (dünne Linie) und reduzierten (dicke Linie) Zustand. B und C: Ausschnitte von 450 nm – 750 nm und 550 nm – 750 nm von TsdAM<sub>209</sub>G (873  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; 32,3  $\mu\text{M}$ ). Oxidation wurde durch die Addition von 3,5  $\mu\text{M}$  Ferricyanid, Reduktion durch die Addition von 10 mM Natriumdithionit erreicht. Alle Spektren wurden in 50 mM BisTris-HCl Puffer pH 6,5 aufgenommen.

Im langwelligeren Bereich oberhalb von 600 nm konnte nur ein Absorptionsmaximum bei 630,4 nm im Spektrum des oxidierten Proteins detektiert werden. Im Gegensatz zu Spektren der beiden TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten konnte kein Peak bei 695 nm festgestellt werden. Dieser Peak kann damit eindeutig auf den Austausch der Aminosäure Methionin zurückgeführt werden. TsdAM<sub>209</sub>G wurde schrittweise mit verschiedenen Konzentrationen

nen Thiosulfat versetzt und nach jeder Zugabe ein Spektrum des Proteins aufgenommen (nicht dargestellt) TsdAM<sub>209</sub>G kann unter den gegebenen Bedingungen nicht durch Thio-sulfat reduziert werden.

In Abbildung 37 sind Differenzspektren dargestellt, bei denen vom TsdA Wildtyp Spektrum, die Spektren der Proteine TsdAK<sub>208</sub>G, TsdAK<sub>208</sub>N oder TsdAM<sub>209</sub>G abgezogen wurden. Diese verdeutlichen, dass in den oxidierten Spektren vor allem Unterschiede in der Wellenlänge und Intensität des Soret-Peaks bestehen (Abbildung 37 A), und kleinere Änderungen im langwelligen Bereich oberhalb von 600 nm (Abbildung 37 C). Im reduzierten Zustand sind es vor allem die Intensitäten von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Peak, die sich stark zwischen den Spektren der einzelnen TsdA-Varianten unterscheiden (Abbildung 37 B und D).

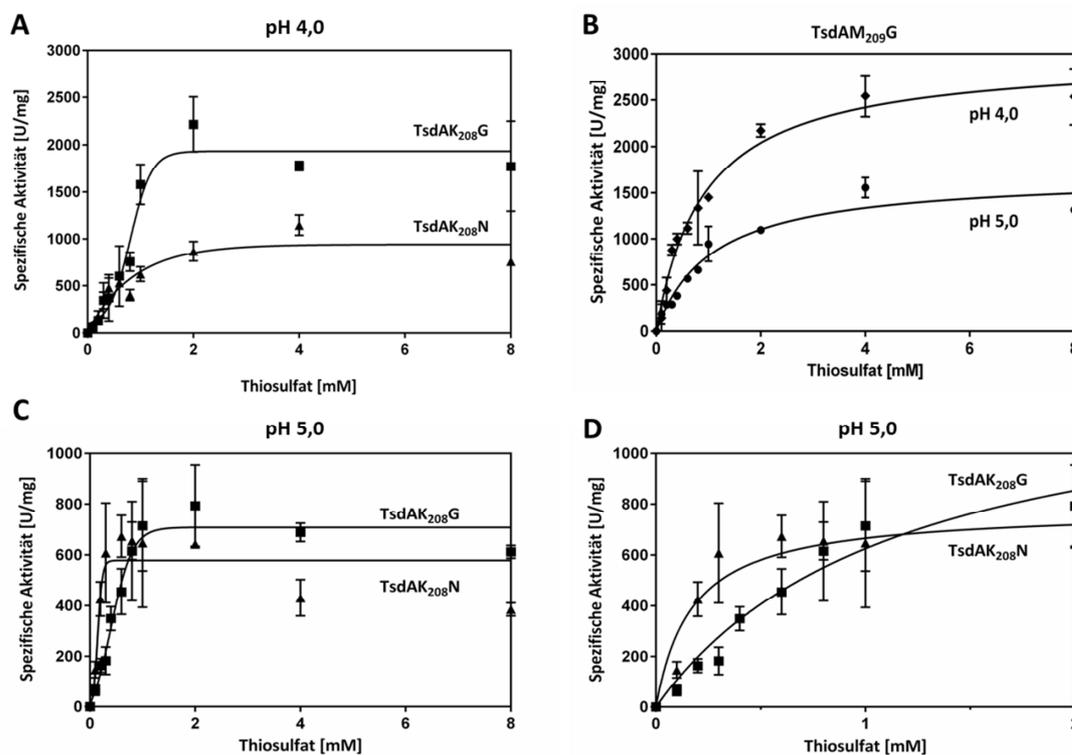


**Abbildung 37:** Differenzspektren der TsdA Lysin<sub>208</sub>- und Methionin<sub>209</sub>-Varianten. Vom TsdA Wildtyp-Protein Spektrum wurde das Spektrum von TsdAK<sub>208</sub>G (dünne Linie), TsdAK<sub>208</sub>N (gepunktete Linie) oder TsdAM<sub>209</sub>G (gestrichelte Linie) im oxidierten (Abbildung A und C) oder reduzierten (B und D) Zustand abgezogen. A und B zeigen Differenzspektren von 350 nm – 750 nm aus denen C und D heraus vergrößert wurden, wo nur der Ausschnitt von 450 nm – 750 nm dargestellt ist.

### 3.3.6. Kinetische Charakterisierung von TsdAK<sub>208</sub>G, TsdAK<sub>208</sub>N und TsdAM<sub>209</sub>G

Die kinetische Charakterisierung der TsdA-Varianten TsdAK<sub>208</sub>G, TsdAK<sub>208</sub>N und TsdAM<sub>209</sub>G wurde analog zur Charakterisierung des TsdA Wildtyp-Proteins durchge-

führt. Die Thiosulfat-Oxidation wurde mit 1 mM Ferricyanid als artifiziellem Elektronenakzeptor bei den pH-Werten 4,0 und 5,0 bestimmt. In Abbildung 38 A ist die spezifische Aktivität der Thiosulfat-Oxidation in Abhängigkeit des Substrates Thiosulfat der beiden TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten bei pH 4,0 dargestellt. Beide TsdA-Varianten unterschieden sich signifikant in der maximalen spezifischen Aktivität  $V_{\max}$  vom TsdA Wildtyp-Protein. So erreichte TsdAK<sub>208</sub>G nur einen  $V_{\max}$  von  $2372 \pm 407$  U/mg und TsdAK<sub>208</sub>N sogar nur von  $1466 \pm 172$  U/mg. Dies bedeutet eine 10- bis 15-fache Verminderung der maximalen Aktivität gegenüber dem TsdA Wildtyp-Protein bei pH 4,0 (Tabelle S 1).

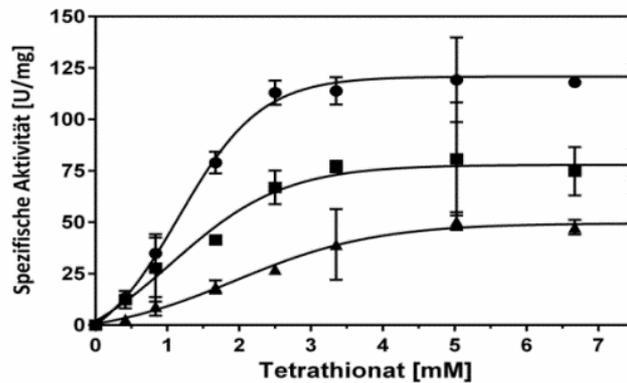


**Abbildung 38:** Vergleich der Thiosulfat-abhängigen Ferricyanid-Reduktion von TsdAK<sub>208</sub>G (Quadrate; Abbildung A, C und D), TsdAK<sub>208</sub>N (Dreiecke; Abbildung A, C und D) und TsdAM<sub>209</sub>G (Kreise und Raute; Abbildung B) bei pH 4,0 und pH 5,0. Die Enzymtests wurden in 100 mM Ammoniumacetat Puffer pH 4,0 oder pH 5,0 mit 1 mM Ferricyanid als artifiziellem Elektronenakzeptor durchgeführt und gestartet durch die Zugabe von TsdAK<sub>208</sub>G ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; 76 nM), TsdAK<sub>208</sub>N ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; 19 nM) oder TsdAM<sub>209</sub>G ( $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; 7,6 nM). Die Abbildungen wurden mit GraphPad Prism (Tabelle 5) erstellt.

Auch für die TsdA-Variante TsdAM<sub>209</sub>G ergab sich bei pH 4,0 nur eine spezifische Aktivität von  $2900 \pm 129$  U/mg (Abbildung 38 B; Tabelle S 1). Die Affinität zum Substrat Thiosulfat änderte sich bei allen drei TsdA-Varianten nicht signifikant gegenüber dem TsdA Wildtyp-Protein. Für TsdAK<sub>208</sub>G wurde ein  $S_{[0.5]}$ -Wert von  $1,1 \pm 0,50$  mM, für TsdAK<sub>208</sub>N ein  $S_{[0.5]}$ -Wert von  $1,28 \pm 0,32$  mM und für TsdAM<sub>209</sub>G wurde ein  $S_{[0.5]}$ -Wert von  $0,9 \pm 0,11$  mM, gemessen (Abbildung 38 A und B; Tabelle S 1). Die deutlich niedrigeren  $V_{\max}$ -Werte führten aber auch zu einer niedrigeren, katalytischen Effizienz der

TsdA-Varianten. Der  $k_{\text{cat}}$ -Wert für TsdAK<sub>208</sub>G wurde mit  $1068 \text{ s}^{-1}$  berechnet, was zu einem  $k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$ -Wert von  $971 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  führte, ca. 12-fach niedriger als die katalytische Effizienz des TsdA Wildtyp-Proteins bei pH 4,0. Auch für die TsdA-Varianten TsdAK<sub>208</sub>N und TsdAM<sub>209</sub>G wurden deutlich niedrigere  $k_{\text{cat}}$ -Werte festgestellt. Für TsdAK<sub>208</sub>N konnte ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $660 \text{ s}^{-1}$  und ein  $k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$ -Wert von  $516 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  errechnet werden, für TsdAM<sub>209</sub>G ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $1330 \text{ s}^{-1}$  und ein  $k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$ -Wert von  $1478 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Tabelle S 1). Änderungen der Häm-Koordination an Häm 2 haben damit offensichtlich einen Einfluss auf die katalytische Aktivität und Effizienz, nicht aber die Substrataffinität, des Proteins bei pH 4,0. Wurden die Messungen bei einem pH-Wert von 5,0 durchgeführt, waren weitere Unterschiede im Vergleich TsdA Wildtyp-Protein zu TsdA Lysin<sub>208</sub>- oder Methionin<sub>209</sub>-Variante zu beobachten. Die  $V_{\text{max}}$ -Werte für TsdAK<sub>208</sub>G, TsdAK<sub>208</sub>N und TsdAM<sub>209</sub>G betragen  $810 \pm 92 \text{ U/mg}$ ,  $778 \pm 81 \text{ U/mg}$  und  $1695 \pm 133 \text{ U/mg}$  und waren damit zwei- bis vierfach niedriger als der  $V_{\text{max}}$  von  $4468 \pm 425 \text{ U/mg}$  des TsdA Wildtyp-Proteins bei pH 5,0 (Abbildung 38 B, C und D; Tabelle S 1). Die Substrataffinitäten zu Thiosulfat waren wie beim TsdA Wildtyp-Protein bei TsdAK<sub>208</sub>G und TsdAK<sub>208</sub>N mit  $S_{[0.5]}$ -Werten von  $0,46 \pm 0,17 \text{ mM}$  und  $0,17 \pm 0,06 \text{ mM}$  auch bei pH 5,0 deutlich höher als bei Messungen die bei pH 4,0 durchgeführt wurden (Abbildung 38 C und D; Tabelle S 1). Um diese Unterschiede zu verdeutlichen wurde in Abbildung 38 D die Kinetik der TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten bei pH 5,0 im Bereich bis 2 mM Thiosulfat heraus vergrößert. Einzig die TsdAM<sub>209</sub>G-Variante wies eine vergleichbare Substrataffinität zu Thiosulfat bei pH 5,0 mit einem  $S_{[0.5]}$ -Wert von  $1,08 \pm 0,22 \text{ mM}$  wie bei pH 4,0 auf (Abbildung 38 B, Tabelle S 1). Durch die höhere Substrataffinität der TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten bei pH 5,0 erreichten diese eine ähnliche oder höhere katalytische Effizienz als bei pH 4,0. Für TsdAK<sub>208</sub>G wurde ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $365 \text{ s}^{-1}$  und ein  $k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$ -Wert von  $793 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , für TsdAK<sub>208</sub>N ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $350 \text{ s}^{-1}$  und ein  $k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$ -Wert von  $2095 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  errechnet. Auch hier unterscheidet sich die TsdA-Variante TsdAM<sub>209</sub>G von den anderen Proteinen mit einem  $k_{\text{cat}}$ -Wert von 764 und einem  $k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$ -Wert von  $711 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , sodass die katalytische Effizienz dieses Proteins bei pH 5,0 nur halb so groß ist wie bei pH 4,0 (Tabelle S 1). Insgesamt unterscheiden sich die TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten neben der Verringerung der maximalen katalytischen Aktivität nicht grundsätzlich in ihren kinetischen Eigenschaften bei der Umsetzung von Thiosulfat zu Tetrathionat im Vergleich zum TsdA Wildtyp-Protein, während die TsdA Methionin<sub>209</sub>-Variante eine Sonderstellung einnimmt, da hier mit Ausnahme der Substrataffinität bei pH 4,0 alle kinetischen Charakteristika im Vergleich zum TsdA Wildtyp-Protein ver-

ändert sind. Die Fähigkeit der TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten Thiosulfat mit geringerer spezifischer Aktivität umzusetzen bestätigt die Ergebnisse und daraus abgeleiteten Vermutungen der spektralen Analyse der Proteine (3.3.4).



**Abbildung 39:** Spezifische Aktivität der Tetrathionat-abhängigen Methylviologen-Oxidation durch TsdAK<sub>208</sub>G (0,3 µg mL<sup>-1</sup>; 11,4 nM; Quadrate), TsdAK<sub>208</sub>N (0,57 µg mL<sup>-1</sup>; 21,7 nM; Dreiecke) und TsdAM<sub>209</sub>G (0,2 µg mL<sup>-1</sup>; 7,6 nM; Kreise). Enzymtests wurden anaerob in 100 mM Ammoniumacetatpuffer pH 5,0 mit 300 µM reduzierten Methylviologen als Elektronendonator durchgeführt und durch die Zugabe von Tetrathionat gestartet. Die Abbildung wurde mit GraphPad Prism (Tabelle 5) erstellt.

Neben der Thiosulfat-Oxidation wurde auch die Tetrathionat-Reduktion der TsdA-Varianten gemessen. In Abbildung 39 ist die spezifische Aktivität in Abhängigkeit der Konzentration an Tetrathionat mit 300 µM reduziertem Methylviologen als Elektronendonator für die drei TsdA-Varianten TsdAK<sub>208</sub>G, TsdAK<sub>208</sub>N und TsdAM<sub>209</sub>G dargestellt. Auffällig ist, dass alle Kurven einen sigmoidalen Verlauf haben, während beim TsdA Wildtyp-Protein eine lineare Kinetik festgestellt werden konnte (Abbildung 23). Die  $V_{\max}$ -Werte variierten von  $49,5 \pm 6,7$  U/mg für TsdAK<sub>208</sub>N, über  $77,9 \pm 23,8$  U/mg für TsdAK<sub>208</sub>G bis zu einem  $V_{\max}$  von  $120,8 \pm 11,5$  für die TsdAM<sub>209</sub>G-Variante (Abbildung 39; Tabelle S 1). Damit wies die TsdA Methionin<sub>209</sub>-Variante eine höhere maximale spezifische Aktivität als das TsdA Wildtyp-Protein auf. Die Substrataffinität der TsdA-Varianten zu Tetrathionat war bei TsdAK<sub>208</sub>G mit einem  $S_{[0,5]}$ -Wert von  $1,17 \pm 0,40$  mM und auch bei TsdAM<sub>209</sub>G mit einem  $S_{[0,5]}$ -Wert von  $1,16 \pm 0,13$  mM deutlich erhöht im Vergleich zum TsdA Wildtyp-Protein. Nur die TsdAK<sub>208</sub>N-Variante hatte eine ähnliche Substrataffinität zu Tetrathionat mit einem  $S_{[0,5]}$ -Wert von  $1,95 \pm 0,27$  mM auf (Abbildung 39; Tabelle S 1).

Die katalytische Effizienz der TsdA-Varianten bei der Umsetzung von Tetrathionat zu Thiosulfat war im Vergleich zur Oxidation von Thiosulfat niedrig. Für TsdAK<sub>208</sub>G wurde ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $37 \text{ s}^{-1}$  und ein  $k_{\text{cat}}/S_{[0,5]}$ -Wert von  $35,9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , für TsdAK<sub>208</sub>N ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $36 \text{ s}^{-1}$  und ein  $k_{\text{cat}}/S_{[0,5]}$ -Wert von  $11,25 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  berechnet. Die TsdAM<sub>209</sub>G-

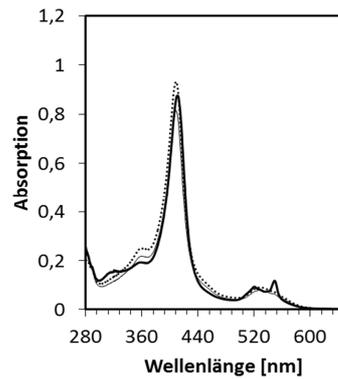
Variante erreichte die vergleichbar höchste katalytische Effizienz mit einem  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $54 \text{ s}^{-1}$  und einem  $k_{\text{cat}}/S_{[0,5]}$ -Wert von  $46,67 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Tabelle S 1). Insgesamt rangieren jedoch alle diese Werte auf einem sehr niedrigen Level, wenn im Vergleich die katalytische Umsetzung von Thiosulfat zu Tetrathionat betrachtet wird. Das TsdA Wildtyp-Protein und alle TsdA-Varianten haben sowohl bei pH 4,0 als auch bei pH 5,0 eine mindestens 10-fach höhere katalytische Effizienz bei der Vollführung dieser Reaktion im Vergleich zur Reduktion von Tetrathionat. Dennoch fällt auf, dass auch hier die TsdAM<sub>209</sub>G-Variante sich in allen kinetischen Charakteristika vom TsdA Wildtyp-Protein unterscheidet.

### 3.4. Mögliche Elektronenakzeptoren der Thiosulfatdehydrogenase aus *A. vinosum*

Im Rahmen der kinetischen Charakterisierung der Thiosulfatdehydrogenase blieb bislang eine entscheidende Frage offen: Was passiert mit den zwei Elektronen, die bei der Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat freigesetzt werden? Um die kinetischen Eigenschaften der TsdAwT und der TsdA-Varianten zu bestimmen wurde Ferricyanid als artifizieller Elektronenakzeptor verwendet, jedoch eignet sich dieses Molekül nicht für eine Annäherung an die Situation *in vivo*.

#### 3.4.1. Pferdeherz Cytochrom *c*

Zunächst sollte geklärt werden ob ein Monohäm oder Dihäm Cytochrom als endogener Elektronenakzeptor in Frage kommt. Bereits 2001 wurden in der Doktorarbeit von Detlef Sperling (Sperling 2001) mit geringen Mengen aus *A. vinosum* aufgereinigtem TsdA, Aktivitätstests mit Pferdeherz Cytochrom *c* als Elektronenakzeptor durchgeführt, wobei keine Aktivität festgestellt werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde über UV-Vis Spektren die Reduktion von oxidiertem Pferdeherz Cytochrom *c* nach der Addition von Thiosulfat und rekombinantem TsdA überprüft. Dabei konnte festgestellt werden, dass AvTsdA nicht in der Lage war Pferdeherz Cytochrom *c* nach der Zugabe von Thiosulfat zu reduzieren (Abbildung 40). Pferdeherz Cytochrom *c* als Monohäm Cytochrom ist kein geeigneter Elektronenakzeptor für AvTsdA.

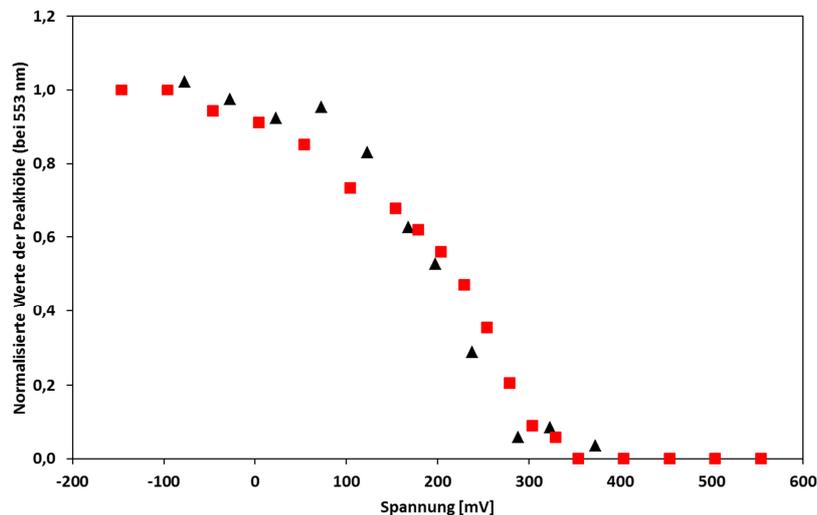


**Abbildung 40:** Reduktion von Pferdeherz Cytochrom *c* durch die AvTsdA nach der Zugabe von Thiosulfat. Aufgenommen wurden UV-Vis Spektren in 100 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,0 von 280 nm – 650 nm des oxidierten Pferdeherz Cytochrom *c* (7,5  $\mu$ M; gepunktete Linie), nach der Zugabe von 8 mM Thiosulfat (dünne Linie) und nach der Zugabe von 102 nM AvTsdA (dicke Linie). Modifiziert nach Abbildung 4 aus Liu et al. 2013.

### 3.4.2. *TsdB* aus *Thiomonas intermedia*

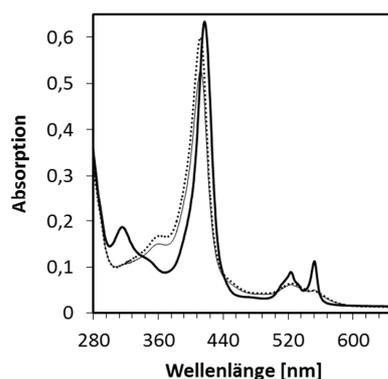
Im Genom des Organismus *T. intermedia* wurde direkt folgend auf das Gen *tint\_2892*, das für ein TsdA-Homolog kodiert, das Gen *tint\_2893*, auch für ein Dihäm *c*-Typ Cytochrom kodierend, identifiziert. Für beide Proteine wird vorhergesagt, dass über ein Sec-abhängiges Signalpeptid der Transport ins Periplasma vermittelt wird. Zusammen in einem Expressionsplasmid geklont, wobei *tint\_2892* mit einem Carboxy-Terminale Strep-Tag versehen wurde, konnten die beiden Proteine koproduziert werden und waren sowohl in der Coomassie- als auch in der Häm Färbung detektierbar. Diese Koproduktion wies auf eine signifikante Interaktion der beiden Proteine miteinander hin (Denkmann et al. 2012). Es stellte sich die Frage ob das, durch *tint\_2893* kodierte Dihäm *c*-Typ Cytochrom TsdB (Thiosulfatdehydrogenase B), auch einen geeigneten Elektronenakzeptor für AvTsdA darstellt. Im Rahmen der Bachelorarbeiten Siemen 2011 und van Helmont 2012 wurde zunächst das Gen *tint\_2893* in einen Expressionsvektor gebracht (pASK-IBATint\_tsdB; Tabelle 10) und TsdB in *E. coli* BL21 Zellen produziert (2.4.2). Das rekombinant produzierte TsdB-Protein hatte ein Molekulargewicht von 21.793 Da (van Helmont 2012). Anschließend konnte für den Soret-Peak, der im oxidierten Zustand bei 412 nm und im reduzierten Zustand bei 417 nm absorbiert, ein Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{417\text{nm}} = 350 \text{ cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$  berechnet werden (van Helmont 2012). Für eine genauere Charakterisierung des Proteins wurde im Rahmen dieser Arbeit das Redoxpotential der TsdB Häm bestimmt. Beide Häme weisen vermutlich eine His/Met-Koordination des zentralen Eisenatoms auf, was vermutlich auf ein hohes Potential der Häm schließen lässt (Reijerse et al. 2007). Die Bestimmung des Redoxpotentials erfolgte potentiometrisch mit Hilfe einer Goldelektrode. Der Versuch wurde mit einer Spannung von 600 mV gestartet,

bei der TsdB sich im oxidierten Zustand befand, und die Spannung dann schrittweise auf  $-150$  mV verringert, sodass TsdB sich im vollständig reduzierten Zustand befand. Anschließend wurde in die umgekehrte Richtung verfahren, um eine Reoxidation des Proteins zu erwirken (Abbildung 41; 2.8.10).



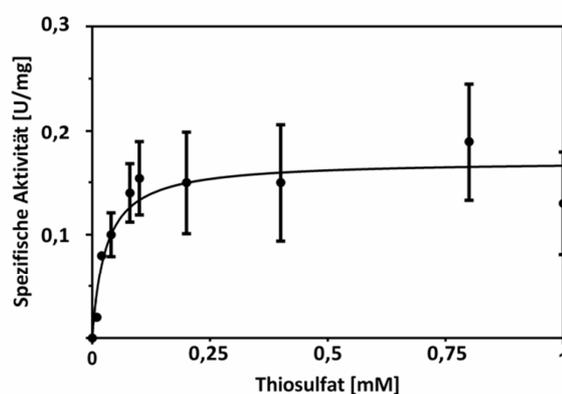
**Abbildung 41:** Bestimmung des Redoxpotentials der TsdB-Häme. Dargestellt ist die angelegte Spannung gegen die normalisierten Werte der  $\alpha$ -Peak Höhe (bei 553 nm) der Reduktion (rote Quadrate) und Reoxidation von TsdB (schwarze Dreiecke), wobei ein Wert von 0 ein komplett oxidiertes TsdB und ein Wert von 1 ein vollständig reduziertes TsdB bedeutet. Eingesetzt wurden  $10 \mu\text{M}$  TsdB in Phosphatpuffer pH 5,0.

Über das in Abbildung 41 dargestellte Verhältnis von normalisierter  $\alpha$ -Peakhöhe zu Spannung konnte mittels der Nernst-Gleichung eine Simulation erstellt werden, die das Redoxpotential beider Häme wiedergibt. Für die beiden, vermutlich His/Met-koordinierten Häme, wurden Potentiale von  $+110$  und  $+270$  mV bestimmt. Auf Basis der Werte für die Redoxpotentiale von TsdA (3.1.2) und TsdB sollte es für TsdA möglich sein Elektronen auf TsdB zu übertragen. In einem nächsten Schritt wurde getestet, ob TsdA in der Lage ist TsdB, nach der Addition von Thiosulfat, zu reduzieren. In Abbildung 42 ist dargestellt, wie durch die Zugabe von Thiosulfat und AvTsdA, TsdB reduziert werden konnte. TsdB ist damit prinzipiell in der Lage als Elektronenakzeptor für TsdA zu dienen (Liu et al. 2013; Denkmann et al. 2012).



**Abbildung 42:** Reduktion von TsdB durch die AvTsdA nach der Addition von Thiosulfat. Aufgenommen wurden UV-Vis Spektren in 100 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,0 von 280 nm – 650 nm des oxidierten TsdB (3  $\mu$ M; gepunktete Linie), nach der Zugabe von 8 mM Thiosulfat (dünne Linie) und nach der Zugabe von 102 nM AvTsdA (dicke Linie). Modifiziert nach Abbildung 4 aus Liu et al. 2013.

Aus diesem Grund wurde eine genauere Charakterisierung der Thiosulfat-abhängigen TsdB Reduktion durch TsdA durchgeführt (Abbildung 43). Die maximale spezifische Aktivität  $V_{max}$  betrug  $0,17 \pm 0,012$  U/mg und ist damit ca. 165.000-fach geringer als die maximale Aktivität mit Ferricyanid als artifiziellem Elektronenakzeptor. Allerdings konnte eine fast 10-fach höhere Affinität zum Substrat Thiosulfat mit einem  $S_{[0.5]}$ -Wert von 0,028 mM festgestellt werden (Abbildung 43). Diese Veränderung der Affinität zum Substrat war so nicht zu erwarten, da der Elektronenakzeptor keinen Einfluss auf die Substratbindung haben sollte.



**Abbildung 43:** Spezifische Aktivität der Thiosulfat-abhängigen TsdB-Reduktion durch AvTsdA. 2,6  $\mu$ M TsdB wurden mit verschiedenen Konzentrationen Thiosulfat versetzt und die Reaktion durch die Zugabe von 3 nM TsdA gestartet (2.8.6). Die Enzymtests wurden in Ammoniumacetatpuffer pH 5,0 durchgeführt. Diese Abbildung wurde mit GraphPad Prism (Tabelle 5) erstellt.

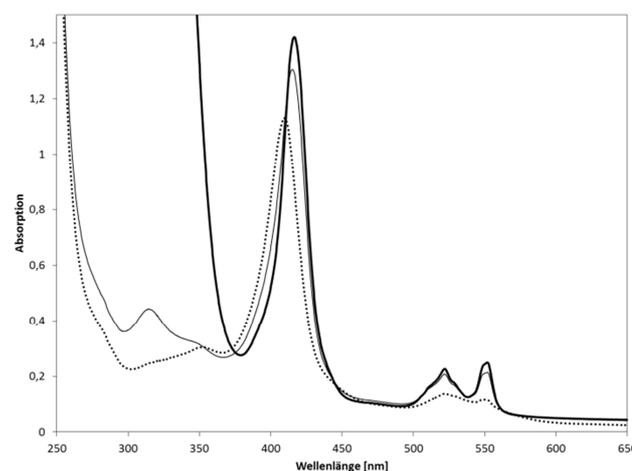
Aus den gemessenen spezifischen Aktivitäten wurde ein  $k_{cat}$ -Wert von  $0,077$   $s^{-1}$  errechnet, woraus sich ein  $k_{cat}/S_{[0.5]}$ -Wert von  $2,7$   $mM^{-1} s^{-1}$  ergibt. Diese sehr geringe katalytische Effizienz in der Umsetzung von Thiosulfat mit TsdB als Elektronenakzeptor zeigt, dass TsdB aus *T. intermedia* keinen optimalen Elektronenakzeptor für AvTsdA darstellt.

Jedoch kommt ein Dihäm *c*-Typ Cytochrom grundsätzlich als Elektronenakzeptor in Frage.

### 3.4.3. *Alvin\_2879* aus *A. vinosum*

In einer Datenbankanalyse wurde *Alvin\_2879* als das Protein mit der größten Sequenzähnlichkeit zu TsdB aus *T. intermedia* in *A. vinosum* identifiziert. In *A. vinosum* wurde 1969 erstmalig das Dihäm *c*-Typ Cytochrom *Alvin\_2879* aus Membranfraktionen isoliert (Cusanovich und Bartsch 1969). Es handelt sich um ein *c*-Typ Cytochrom 553 mit einem Soret-Peak bei 417,5 nm im reduzierten Zustand und einem sehr positiven Redoxpotential von + 330 mV bei pH 7,0. Aufgrund des hohen Redoxpotentials gilt *Alvin\_2879* als möglicher Elektronendonator für das photosynthetische Reaktionszentrum oder für ein anderes *c*-Typ Cytochrom (C-555) (Cusanovich und Bartsch 1969). Außerdem kommt *Alvin\_2879* aus diesem Grund als endogener Elektronenakzeptor für TsdA in Frage (3.1.2).

Im Rahmen der Bachelorarbeit Koch 2012 wurde das Gen *alvin\_2879* in einen Expressionsvektor kloniert (Tabelle 10) und in *E.coli* BL21 Zellen das Protein *Alvin\_2879* produziert. Das Protein konnte in der Häm- und Coomassiefärbung mit einer erwarteten Größe von 22,6 kDa nachgewiesen werden. Allerdings wurden mit beiden Färbemethoden weitere Banden zwischen 40 und 50 kDa detektiert (Koch 2012).



**Abbildung 44:** Reduktion von *Alvin\_02879* durch die AvTsdA nach der Addition von Thiosulfat. Aufgenommen wurden UV-Vis Spektren in 100 mM Ammoniumacetat Puffer pH 5,0 von 250 nm – 650 nm des Thiosulfat (8 mM) reduzierten *Alvin\_2879* (2 µM; gepunktete Linie), nach der Zugabe von 163 nM AvTsdA (dünne Linie) und nach der Zugabe von 10 mM Natriumdithionit (dicke Linie). Diese Abbildung ist eine modifizierte Darstellung der Abbildung 4.21 aus Koch 2012.

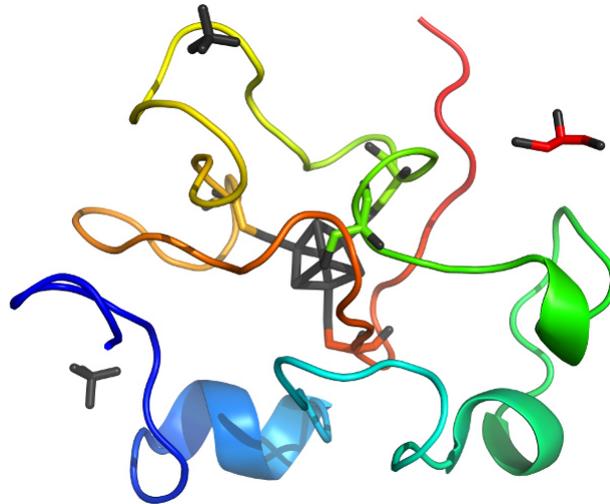
Nach der Aufreinigung des Proteins *Alvin\_2879* wurde mittels UV-Vis Spektroskopie getestet ob dieses als Elektronenakzeptor für AvTsdA dienen kann. Dafür wurden Spek-

tren des oxidierten Proteins (nicht dargestellt), nach der Zugabe von Thiosulfat und schließlich nach der Zugabe von AvTsdA aufgenommen um eine mögliche Reduktion von Alvin\_2879 durch die TsdA nachzuweisen (Abbildung 44). Nach der Zugabe von Thiosulfat konnte nur eine minimale Reduktion beobachtet werden, allerdings führte die Addition von AvTsdA zu einer deutlichen Reduzierung des Proteins Alvin\_2879, erkennbar an der Ausprägung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peak, sowie einer Absorptionsintensitätssteigerung des Soret-Peaks (Abbildung 44). Im Vergleich mit einem Spektrum des reduzierten Alvin\_2879 zeigte sich jedoch, dass es sich hierbei nur um eine partielle Reduktion handelt (Abbildung 44). Um zu überprüfen, ob Alvin\_2879 ein möglicher *in vivo* Elektronenakzeptor der TsdA ist, wurde zunächst der Extinktionskoeffizient bestimmt ( $\epsilon_{420\text{nm}} = 178,29 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) und dann die spezifische Aktivität der Thiosulfat-Oxidation durch TsdA mit Alvin\_2879 als Elektronenakzeptor quantifiziert. Dabei wurde eine maximale spezifische Aktivität  $V_{\text{max}}$  von 0,2 U/mg bei pH 5,5 gemessen (Koch 2012). Die maximale Aktivität bewegt sich in der gleichen Größenordnung wie der  $V_{\text{max}}$ -Wert für die Thiosulfatdehydrogenase-Aktivität von AvTsdA mit TsdB als Elektronenakzeptor (3.4.2). Alvin\_2879 stellt keinen effektiveren Elektronenakzeptor als der exogene Elektronenakzeptor TsdB dar. Allerdings war die Qualität der verwendeten Proteinprobe nicht optimal, da in der Häm Färbung zusätzlich zur Bande des rekombinant produzierten Alvin\_2879 Monomers weitere Banden oberhalb von 40 kDa sichtbar waren (s. o.). Um dieser Problematik entgegen zu wirken, wurde im Rahmen dieser Arbeit Alvin\_2879 erneut rekombinant produziert und nachfolgend an die Strep-Tag Affinitätschromatographie, eine zusätzliche Aufreinigung mittels Gelfiltration (2.7.1) vorgenommen. Von Protein-enthaltenen Fraktionen wurde ein UV-Vis Spektrum aufgenommen und der Reinheitsgrad bestimmt. Alvin\_2879 neigt *in vitro* zur Oligomerisierung und es konnte über die Gelfiltration eine monomere, dimere, trimere und tetramere Form nachgewiesen werden. Dabei überschneiden sich die Fraktionen der verschiedenen Oligomere, sodass eine Auftrennung nicht möglich war (nicht dargestellt).

#### 3.4.4. HiPIP (Alvin\_2274) aus *A. vinosum*

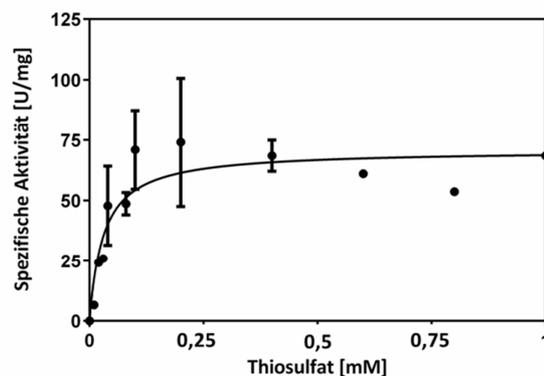
HiPIP ist ein Ferredoxin-ähnliches Protein mit einem Eisen-Schwefel-Cluster als Cofaktor und einem Redoxpotential von + 360 mV. In *A. vinosum* dient HiPIP unter photolithoautotrophen Wachstumsbedingungen als direktes Reduktionsmittel für das photosynthetische Reaktionszentrum (Verméglio et al. 2002). HiPIP wird durch das Gen *alvin\_2274* kodiert, das auch ein Tat-Signalpeptid zur Translokation des Proteins ins Periplasma enthält (Brüser et al. 1997). Im Periplasma hat das reife Protein ein Molekularge-

wicht von 8,9 kDa (Abbildung 45). Das hohe Redoxpotential von HiPIP macht eine Übertragung von Elektronen von AvTsdA auf dieses Protein möglich.



**Abbildung 45:** Schematische Darstellung der 3D-Struktur von HiPIP. Das [4Fe-4S] Cluster ist in grau dargestellt. Copyright © 1994-2014 The SCOP and SCOPe authors. scope@compbio.berkeley.edu

Im Rahmen der Bachelorarbeit Franke 2013 wurde das Expressionsplasmid pET-*Alvin\_2274-C-strep* erstellt. Das Plasmid wurde in *E. coli* BL21 Zellen gebracht und rekombinant HiPIP mit enthaltenem Eisen-Schwefel-Cluster produziert (2.4.4). Über UV-Vis Differenzspektren konnte ein molekularer Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{480\text{nm}} = 4,81 \text{ cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$  bestimmt werden (Franke 2013). Bei dieser Wellenlänge absorbiert das Eisen-Schwefel-Cluster des Proteins, das oxidiert oder reduziert vorliegen kann. Im Enzymtest wurde bei 480 nm die Reduktion von HiPIP nach der Zugabe von Thiosulfat durch die AvTsdA verfolgt und so die spezifische Aktivität für die Thiosulfat-abhängige HiPIP-Reduktion bestimmt.



**Abbildung 46:** Spezifische Aktivität der Thiosulfat-abhängigen HiPIP-Reduktion durch AvTsdA. 50  $\mu\text{M}$  HiPIP wurden mit verschiedenen Konzentrationen Thiosulfat versetzt und die Reaktion durch die Zugabe von 95 nM TsdA gestartet (2.8.5). Die Enzymtests wurden in Ammoniumacetatpuffer pH 5,0 durchgeführt. Diese Abbildung wurde mit GraphPad Prism (Tabelle 5) erstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für AvTsdA eine maximale spezifische Aktivität  $V_{\max}$  von  $70,8 \pm 5,4$  U/mg bestimmt (Abbildung 46). Diese Aktivität ist ca. 350-fach höher, als die mit den potentiellen Elektronenakzeptoren TsdB oder Alvin\_2879 gemessenen Aktivitäten. Die Affinität zum Substrat Thiosulfat war mit einem  $S_{[0.5]}$ -Wert von 0,03 mM vergleichbar hoch wie die Substrataffinität zu Thiosulfat, wenn TsdB als exogener Elektronenakzeptor fungierte (3.6.2). Aus den gemessenen spezifischen Aktivitäten ergab sich ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $32 \text{ s}^{-1}$  und ein  $k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$ -Wert von  $1062 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Die katalytische Effizienz der AvTsdA mit HiPIP als endogenem Elektronenakzeptor ist fast 400-fach höher als mit dem Elektronenakzeptor TsdB. Die vergleichsweise hohe katalytische Effizienz und hohe Substrataffinität von TsdA mit HiPIP als Elektronenakzeptor *in vitro* lassen darauf schließen, dass HiPIP auch *in vivo* als dieser fungieren kann.

### 3.5. Biochemische und kinetische Charakterisierung der TsdA aus *C. jejuni*

#### 3.5.1. Klonierung und Produktion von C8j\_0815 (CjTsdA) und C8j\_0040

Ein *tsdA*-homologes Gen in *C. jejuni* konnte in einer vergleichenden Datenbankanalyse identifiziert werden (Abbildung 47; (Denkmann 2011)). Zusätzlich wurde ein zweites homologes Gen in *C. jejuni* identifiziert (C8j\_0040), welches sich in nur einem Punkt wesentlich von C8j\_0815 unterscheidet, die hoch konservierte Aminosäure Cystein ist durch ein Methionin ausgetauscht (Liu et al. 2013). In *A. vinosum* ist das stark konservierte Cystein<sub>96</sub> essentiell für die katalytische Aktivität der Thiosulfatdehydrogenase, was die natürlich vorhandene Kopie mit einer Punktmutation an genau dieser Stelle besonders interessant für eine kinetische Charakterisierung macht.



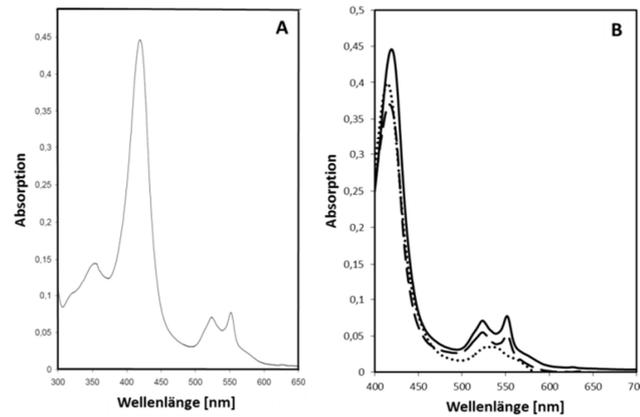
**Abbildung 47:** Alignment von AvTsdA und TsdA-Homologen Proteinen. Das Alignment vergleicht die Sequenz von *A. vinosum* TsdA (*Alvin\_0091*) mit homologen Genen aus *Campylobacter jejuni* (C8J\_0815), *Helicobacter felis* (HFELIS\_01540), *Brucella abortus* (BAbS19\_II07870), *Laribacter hongkongensis* (LHK\_00203), *Ralstonia picketii* (Rpic12D\_0327), *Bordetella parapertussis* (BPP3004) und *Bordetella pertussis* (BP1579). Dargestellt ist nur der Ausschnitt mit den zwei Hämbindemotiven (Kasten) und den potentiellen distalen Häm-Liganden (schwarze Pfeile). Die Gennummern entstammen der KEGG Datenbank (Tabelle 5).

Beide *tsdA*-homologen Gene wurden im Rahmen der Bachelorarbeit (Kosciow 2011) zunächst in den Expressionsplasmid pPR-IBApelB kloniert und die Plasmide pEtsdA und pEcj0040 (Tabelle 10) erhalten. Die erstellten Plasmide enthielten das jeweils entsprechende Gen an einen C-Terminalen Strep-Tag fusioniert. Anschließend konnten die Plasmide in *E. coli* BL21 Zellen (enthielten auch den Vektor pEC86; Tabelle 10) gebracht werden. Die Proteine wurden unter spezifischen Bedingungen produziert (2.4.5) und aufgereinigt. Es konnten im Rahmen dieser Arbeit 700 µg/L *E. coli*-Kultur von CjTsdA und 121 µg/L *E. coli*-Kultur von Cj0040 erhalten werden. Beide Proteine konnten sowohl in der Häm Färbung als auch der Coomassiefärbung mit der erwarteten mole-

kularen Masse nachgewiesen werden (Liu et al. 2013). CjTsdA hat eine molekulare Masse von 36,6 kDa und C8j\_0040 von 39,5 kDa, jeweils inklusive des Strep-Tags und zwei kovalent gebundenen Hämen. Anzumerken ist, dass die Produktion von größeren Mengen C8j\_0040 sich als sehr schwierig gestaltete. Möglicherweise ist das Protein nicht stabil unter den gewählten Bedingungen.

### 3.5.2. Spektroskopische Charakterisierung der CjTsdA

Unmittelbar nach der Aufreinigung des Cytochroms wurden UV-Vis Spektren von rekombinantem CjTsdA aufgenommen. In dem Spektrum war der Soret-Peak bei 419,5 nm, der  $\alpha$ -Peak bei 552 nm und der  $\beta$ -Peak bei 523,5 nm sichtbar, wenn das Protein im frisch aufgereinigten Zustand vorlag (Abbildung 48). Die deutliche Ausprägung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peak wiesen auf einen teil-reduzierten Zustand des Proteins hin, ähnlich wie dieser schon für AvTsdA beobachtet werden konnte (3.1.3). Durch die Zugabe von Ferricyanid konnte CjTsdA vollständig oxidiert werden, wodurch sich der Soret-Peak in den kurzwelligeren Bereich nach 414,5 nm verschob. Der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peak bildeten dann eine charakteristische Schulter aus und das Auftreten eines zusätzlichen Peaks bei 570 nm konnte beobachtet werden (Abbildung 48). Durch die Zugabe von 2 mM Thiosulfat konnte CjTsdA wieder in den teil-reduzierten Zustand versetzt werden, was ein erster Hinweis auf eine katalytische Aktivität mit dem Substrat Thiosulfat war (Abbildung 48). Eine vollständige Reduktion des Proteins gelang durch die Addition von Natriumdithionit. Der Soret-Peak verschob sich in den langwelligeren Bereich nach 421,5 nm und der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peak hatten ihr Absorptionsmaximum bei 554 nm und 524 nm. Ein zusätzlicher Peak, mit sehr schwacher Intensität bei 625 nm, konnte detektiert werden. Insgesamt unterschieden sich die spektralen Charakteristika nicht wesentlich von denen des Proteins aus *A. vinosum* (3.1.3).



**Abbildung 48:** Spektrale Analyse von CjTsdA. A: Dargestellt ist der 300 nm – 650 nm Ausschnitt aus dem UV-Vis Spektrum des frisch aufgereinigten CjTsdA (285  $\mu\text{g/mL}$ ; 7,8  $\mu\text{M}$ ). Modifizierte Abbildung S3 aus Liu et al. 2013. B: UV-Vis Spektren von CjTsdA (285  $\mu\text{g/mL}$ ; 7,8  $\mu\text{M}$ ) im oxidierten Zustand (gepunktete Linie), durch die Zugabe von 2 mM Thiosulfat teil-reduzierten Zustand (gestrichelte Linie) und reduzierten Zustand (durchgezogene Linie). Oxidation wurde durch die Zugabe von 7  $\mu\text{M}$  Ferricyanid, Reduktion durch die Zugabe von 10 mM Natriumdithionit erreicht. Spektren wurden in 20 mM Tris-HCl pH 8,0 bei 42°C aufgenommen. Modifizierte Abbildung aus (Kosciow 2011).

### 3.5.3. Kinetische Charakterisierung der rekombinanten CjTsdA

Das rekombinante Protein war in der Lage Thiosulfat-abhängig Ferricyanid zu reduzieren und konnte Thiosulfat zu Tetrathionat mit der erwarteten stöchiometrischen Rate von 2:1 umsetzen (Kosciow 2011). Ein  $S_{[0,5]}$ -Wert von 0,18 mM wurde für die Umsetzung von Ferricyanid ermittelt und oberhalb von 1 mM Ferricyanid konnte kein Anstieg der enzymatischen Aktivität gemessen werden (Liu et al. 2013).

Die rekombinant produzierte CjTsdA wurde in zwei verschiedenen Enzymtests eingesetzt, der Thiosulfat-abhängigen Reduktion von Ferricyanid (2.8.3) und der Tetrathionat-abhängigen Oxidation von reduziertem Methylviologen (2.8.8). Zunächst mussten jedoch ein Temperatur- und ein pH-Optimum für die Durchführung der Reaktionen bestimmt werden. Das pH-Optimum wurde mit 1 mM Ferricyanid als Elektronenakzeptor und 8 mM Thiosulfat als Substrat bei einer Temperatur von 42°C bestimmt und ergab den pH-Wert 4,0 (Liu et al. 2013; Kosciow 2011). Die Enzymaktivität erreichte ihr Maximum bei 45°C und verblieb auf dem gleichen Level bis zu einer Temperatur von 55°C (Liu et al. 2013; Kosciow 2011), was mit dem Wachstumsoptimum für *C. jejuni* von 42 °C korrelierte (Daten nicht enthalten). Nachfolgende Versuche wurden im Rahmen dieser Arbeit bei 42 °C durchgeführt, da diese Temperatur den Bedingungen *in vivo* am nächsten kommt.

**Tabelle 16: Vergleich der Thiosulfatdehydrogenase- und Tetrathionatreduktase-Aktivität der Proteine AvTsdA und CjTsdA\***

Reaktion pH	Thiosulfat --> Ferricyanid				Tetrathionat --> Methylviologen			
	pH 4.0				pH 5.0			
Parameter	$V_{\max}$	$k_{\text{cat}}$	$S_{[0.5]}$	$k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$	$V_{\max}$	$k_{\text{cat}}$	$S_{[0.5]}$	$k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$
Einheit	$\text{U mg}^{-1}$	$\text{s}^{-1}$	mM	$\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\text{U mg}^{-1}$	$\text{s}^{-1}$	mM	$\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$
<b>AvTsdA</b>	28.600±2500	14.000	1,1±0,20	12.727	82±3,4	37,0	1,98±0,32	18,7
<b>CjTsdA</b>	990±42	604	2,0±0,00	302	64±1,1	42,6	0,01±0,00	4.260,0

\*Modifiziert nach Tabelle 1 aus Liu et al. 2013.

In Tabelle 16 werden verschiedene Parameter der Thiosulfatdehydrogenase- und Tetrathionatreduktase-Aktivität der Proteine AvTsdA und CjTsdA verglichen. CjTsdA erreichte eine maximale spezifische Aktivität für die Oxidation von Thiosulfat mit einem  $V_{\max}$ -Wert von  $990 \pm 42 \text{ U/mg}$ , was eine 28-fach geringere Aktivität im Vergleich zu der TsdA aus *A. vinosum* bedeutet. Außerdem zeichnete sich, die CjTsdA katalysierte Thiosulfat-Oxidation, durch eine relativ niedrige Substrataffinität zu Thiosulfat mit einem  $S_{[0.5]}$ -Wert von 2 mM aus. Aus diesen Werten berechnete sich ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $604 \text{ s}^{-1}$  und eine katalytische Effizienz  $k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$  von  $302 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Tabelle 16). Die TsdA aus *A. vinosum* ist 42-fach effizienter in der Umsetzung von Thiosulfat zu Tetrathionat als das TsdA-Homologe Protein aus *C. jejuni*.

Die Analyse der durch CjTsdA katalysierten Reduktion von Tetrathionat ergab eine maximale spezifische Aktivität  $V_{\max}$  von  $64 \pm 1,1 \text{ U/mg}$  und war damit etwas geringer als die  $82 \text{ U/mg}$ , welche für die TsdA aus *A. vinosum* bestimmt werden konnten. Allerdings konnte eine Substrataffinität mit einem  $S_{[0.5]}$ -Wert von 0,01 mM zu dem Substrat Tetrathionat festgestellt werden. Diese sehr hohe Affinität führt zusammen mit einem  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $42,6 \text{ s}^{-1}$  zu einer katalytischen Effizienz  $k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$  von  $4260 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Tabelle 16). CjTsdA kann 224-fach effizienter Tetrathionat zu Thiosulfat umsetzen als AvTsdA. Es handelt sich bei der CjTsdA um ein bifunktionales Enzym mit der Fähigkeit zur Thiosulfat-Oxidation und Tetrathionat-Reduktion.

#### 3.5.4. Wachstumsexperimente mit *C. jejuni*

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dave Kelly (Sheffield, UK) wurden in vivo Experimente mit *C. jejuni* von Yang-Wei Liu durchgeführt. Für eine detaillierte Charakterisierung wurde der *C. jejuni* Stamm 81116 gewählt, von dem auch eine *ΔtsdA*-Mutante erstellt werden konnte (Liu et al. 2013). Der Wildtyp Stamm konnte

auf Tetrathionat wachsen, während die Mutante dazu nicht in der Lage war. Der Wildtyp Stamm setzte 10 mM Tetrathionat zu 20 mM Thiosulfat im stöchiometrischen Verhältnis 1:2 um, während die *AtsdA*-Mutante nahezu kein Tetrathionat verbrauchte. Die Umsetzung von einem Molekül Tetrathionat zu zwei Molekülen Thiosulfat lässt auf eine Tetrathionatreduktion der TsdA in dem *C. jejuni* 81116 Wildtyp Stamm schließen. Über die Deletion von *tsdA*, konnte eine spezifische Abwesenheit von CjTsdA in der Coomassie- und Häm Färbung von periplasmatischen Proteinen aus *C. jejuni* erreicht werden (Liu et al. 2013). Experimente zur Atmungsrate des Wildtyp-Stammes, der *AtsdA*-Mutante und der Komplementationsmutante zeigten eindeutig, dass CjTsdA im Wildtyp als Tetrathionatreduktase fungiert. Über den Thiosulfat-abhängigen Verbrauch von Sauerstoff konnte weiterhin bewiesen werden, dass die CjTsdA die Oxidation von Thiosulfat an den Elektronentransport zu Sauerstoff koppeln kann. In Wachstumsversuchen wurden der *C. jejuni* 81116 Wildtyp Stamm und die *AtsdA*-Mutante kinetisch charakterisiert (Liu et al. 2013). Deutliche Unterschiede bei der Umwandlung von Thiosulfat und Tetrathionat konnten zwischen dem Wildtyp-Stamm und der *AtsdA*-Mutante beobachtet werden (Liu et al. 2013).

### 3.6. Mögliche Elektronenakzeptoren der CjTsdA

Der CjTsdA konnte eine *in vivo* Funktion zugeordnet werden und das rekombinante Protein wurde sowohl spektroskopisch als auch kinetisch charakterisiert. Ein funktioneller Unterschied zur TsdA aus *A. vinosum* offenbarte sich und es stellt sich die Frage auf welches Protein die zwei frei werdenden Elektronen von der CjTsdA übertragen werden?

#### 3.6.1. Das TsdA Homologe Protein C8j\_0040

Unter 3.5.1 wurde die Produktion des TsdA-Homologen Proteins C8j\_0040 beschrieben. Möglicherweise kann dieses Protein auch eine Funktion als TsdA in *C. jejuni* ausüben oder aber einen endogenen Elektronenakzeptor für CjTsdA darstellen. Das Protein C8j\_0040 wies ein *c*-Typ Cytochrom typisches Spektrum, mit einem Soret-Peak bei 423 nm,  $\alpha$ -Peak bei 554 nm und  $\beta$ -Peak bei 524 nm in dem reduzierten Zustand auf (Liu et al. 2013). Allerdings konnte im Test mit 1 mM Ferricyanid als Elektronenakzeptor nur eine maximale spezifische Aktivität  $V_{\max}$  von 19 U/mg in Abhängigkeit von Thiosulfat gemessen werden. Auch für die Methylviologen-abhängige Reduktion von Tetrathionat konnte nur eine sehr niedrige spezifische Aktivität  $V_{\max}$  von 1,5 U/mg bestimmt werden. Diese Beobachtungen zeigen, dass ein Austausch von Cystein zu Methionin nur eine geringe TsdA-Aktivität ermöglicht (Liu et al. 2013). Eine ähnliche Beobachtung konnte

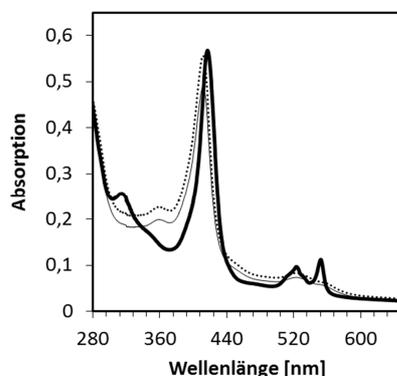
auch schon für die AvTsdA-Variante TsdAC<sub>96</sub>M gemacht werden (3.2.1). In dieser Variante ist das stark konservierte Cystein ebenfalls durch ein Methionin ausgetauscht.

Weiterhin war es bei pH 5,0 nicht mit katalytischen Mengen von CjTsdA möglich das Protein C8j\_0040 in Anwesenheit von Thiosulfat zu reduzieren. Eine Funktion als Elektronenakzeptor von C8j\_0040 für CjTsdA kann damit ausgeschlossen werden (Liu et al. 2013).

Eine *c8j\_0040*-Deletionsmutante des *C. jejuni* Stammes 81116 wurde im Rahmen der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dave Kelly (Sheffield, UK) von Yang-Wei Liu erstellt und die Thiosulfat-Oxidationsrate mit einer Sauerstoff-Elektrode, sowie die Tetrathionat-Reduktion in Inkubationstests mit Formiat als Elektronendonator getestet. In beiden Tests konnte kein signifikanter Unterschied zu den Ergebnissen, welche mit dem Wildtyp Stamm erzielt wurden, beobachtet werden. C8j\_0040 zeigte keinerlei Aktivitäten, welche für eine physiologische Relevanz des Proteins sprechen (Liu et al. 2013).

### 3.6.2. TsdB aus *T. intermedia*

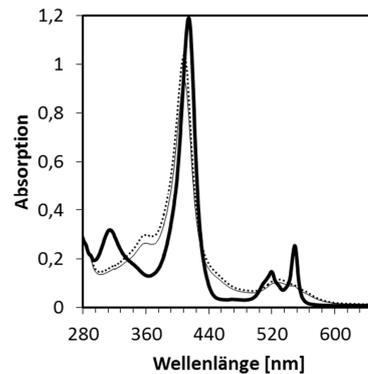
Für die TsdA aus *A. vinosum* konnte TsdB aus *T. intermedia* als Elektronenakzeptor dienen (3.4.2), weshalb auch für CjTsdA dieses Dihäm *c*-Typ Cytochrom als potentieller Elektronenakzeptor getestet wurde. Jedoch konnte nach einer Zugabe von 8 mM Thiosulfat und einer katalytischen Menge CjTsdA zu TsdB nur eine partielle Reduktion des Proteins erreicht werden. In dem UV-Vis Spektrum verschob sich der Soret-Peak, nicht in den langwelligeren Bereich und der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peak erreichten nicht die maximale Absorptionsintensität (Abbildung 49, vergleiche Abbildung 42). Ein Dihäm Cytochrom *c* wurde deshalb als endogener Elektronenakzeptor für die CjTsdA ausgeschlossen.



**Abbildung 49:** Reduktion von TsdB durch CjTsdA nach der Zugabe von Thiosulfat. Aufgenommen wurden UV-Vis Spektren in 100 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,0 von 280 nm – 650 nm des oxidierten TsdB (3 µM; gepunktete Linie), nach der Zugabe von 8 mM Thiosulfat (dünne Linie) und nach der Zugabe von 74 nM CjTsdA (dicke Linie).

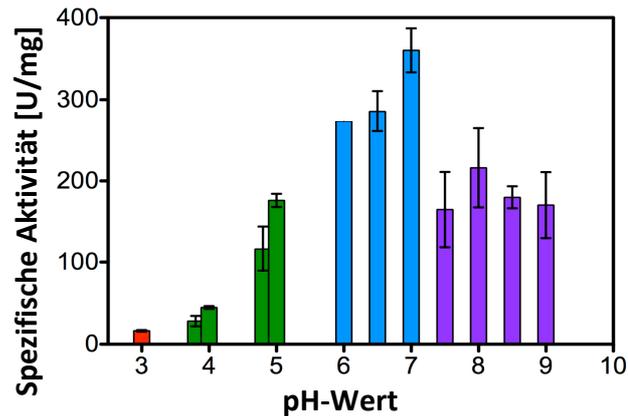
### 3.6.3. Pferdeherz Cytochrom *c*

Nach einer Zugabe von 8 mM Thiosulfat und 74 nM CjTsdA zu 7,5  $\mu$ M Pferdeherz Cytochrom *c* konnte eine vollständige Reduktion des *c*-Typ Cytochroms beobachtet werden (Abbildung 50). Im Gegensatz zu AvTsdA (Abbildung 40), ist CjTsdA in der Lage ein Monohäm *c*-Typ Cytochrom als Elektronenakzeptor zu nutzen.



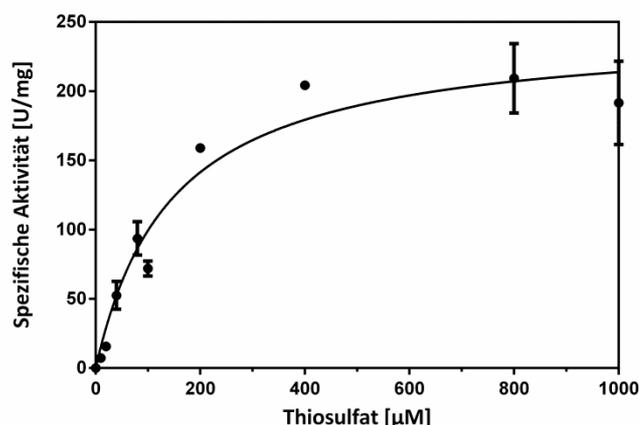
**Abbildung 50:** Reduktion von Pferdeherz Cytochrom *c* durch die CjTsdA nach der Zugabe von Thiosulfat. Aufgenommen wurden UV-Vis Spektren in 100 mM Ammoniumacetat Puffer pH 6,0 von 280 nm – 650 nm des oxidierten Pferdeherz Cytochrom *c* (7,5  $\mu$ M; gepunktete Linie), nach der Zugabe von 8 mM Thiosulfat (dünne Linie) und nach der Zugabe von 74 nM CjTsdA (dicke Linie). Modifiziert nach Abbildung 4 aus Liu et al. 2013.

Die Reaktion von CjTsdA mit Pferdeherz Cytochrom *c* wurde aus diesem Grund detaillierter charakterisiert. In ersten Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass 80  $\mu$ M Cytochrom im Sättigungsbereich der enzymatischen Reaktion mit dem Substrat Thiosulfat liegen (Daten nicht dargestellt; (Liu et al. 2013)). Ein pH-Optimum von 7,0 konnte für die Reduktion von Pferdeherz Cytochrom *c* ( $\epsilon = 21,1 \text{ cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$  (van Gelder und Slater 1962)) durch die CjTsdA bestimmt werden (Abbildung 51). Die maximale spezifische Aktivität wurde mit einem  $V_{\text{max}}$ -Wert von 350 U/mg bestimmt. Der neutrale pH-Wert, als Optimum der Reaktion, entspricht auch den physiologisch optimalen Wachstumsbedingungen von *C. jejuni*, weshalb Pferdeherz Cytochrom *c* als Elektronenakzeptor für die Thiosulfat-Oxidation durch CjTsdA besser mit den Bedingungen *in vivo* vergleichbar ist als der artifizielle Elektronenakzeptor Ferricyanid. Auffällig ist, dass die enzymatische Aktivität bei alkalischen Bedingungen zwar stark abnimmt, aber bis zu einem pH-Wert von 9,0 auf dem gleichen Level verbleibt. Unter sauren Bedingungen konnte eine vergleichsweise geringe Aktivität gemessen werden. Die spezifische Aktivität betrug bei pH 4,0 nicht einmal 50 U/mg, bei dem mit Ferricyanid als Elektronenakzeptor noch ein Wert von 990 U/mg erreicht werden konnte. Schon für AvTsdA wurde mit Ferricyanid ein niedrigeres pH-Optimum für die Thiosulfat-Oxidation bestimmt als mit anderen möglichen Elektronenakzeptoren (vergleiche 3.1.4 und 3.4).



**Abbildung 51:** Reduktion von Pferdeherz Cytochrom *c* durch CjTsdA in Abhängigkeit vom pH-Wert. 80  $\mu\text{M}$  Cytochrom *c*, 8 mM Thiosulfat und 82 nM CjTsdA sowie 100 mM geeigneter Puffer (rot: Citratpuffer; Grün: Acetatpuffer; Blau: Bis-Tris Puffer; Violett: Tris-HCl Puffer) wurden eingesetzt (2.8.4). Die Reaktionen wurden bei 42 °C durchgeführt und durch die Zugabe des Enzyms gestartet. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Reaktion. Modifiziert nach Abbildung S4 aus Liu et al. 2013.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zu Ferricyanid als Elektronenakzeptor zu haben, wurde zunächst die Thiosulfat-abhängige Pferdeherz Cytochrom *c* Reduktion durch die CjTsdA bei pH 5,0 untersucht. CjTsdA erreichte eine maximale spezifische Aktivität  $V_{\text{max}}$  von  $245 \pm 19$  U/mg (Abbildung 52). Dieser Wert entspricht dem zuvor gemessenen Wert im Rahmen der Bestimmung des pH-Optimums. Die Substrataffinität zu dem Substrat Thiosulfat war mit einem  $S_{[0.5]}$ -Wert von  $150 \pm 30$   $\mu\text{M}$  (0,15 mM), im Vergleich zur Affinität mit Ferricyanid als Elektronenakzeptor, hoch. Mit Ferricyanid als artifiziellm Elektronenakzeptor konnte nur eine Substrataffinität zu Thiosulfat von 2 mM bestimmt werden (Tabelle S 1). Ein ähnlicher Unterschied in der Affinität zu dem Substrat in Abhängigkeit vom Elektronenakzeptor wurde auch für AvTsdA festgestellt (vergleiche 3.1.4 und 3.4.2).



**Abbildung 52:** Reduktion von Pferdeherz Cytochrom *c* durch CjTsdA in Abhängigkeit von Thiosulfat. 80  $\mu\text{M}$  Cytochrom *c* und 100 mM Acetatpuffer pH 5,0 wurden mit verschiedenen Konzentrationen Thiosulfat versetzt und die Reaktion durch die Zugabe von 82 nM CjTsdA gestartet. Die Durchführung erfolgte bei 42 °C nach 2.8.4. Die Abbildung wurde mit Graph Pad Prism erstellt (Tabelle 5).

Aus den gemessenen Werten ergab sich ein  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $151 \text{ s}^{-1} \pm 12$  und ein  $k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$ -Wert von  $1066 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Damit wurde bei pH 5,0 eine dreimal höhere katalytische Effizienz mit Pferdeherz Cytochrom *c* als Elektronenakzeptor im Vergleich zu Tests mit Ferricyanid als Elektronenakzeptor, erreicht. Offen bleibt noch eine kinetische Charakterisierung des Enzyms bei dem pH-Optimum von 7,0. Die Daten aus diesen Versuchen sprechen aber eindeutig für ein Monohäm *c*-Typ Cytochrom als Elektronenakzeptor für die TsdA aus *C. jejuni*.

### 3.7. Das Fusionsprotein TsdA/TsdB aus *M. purpuratum*

Im Organismus *Marichromatium purpuratum* konnte ein Tetrahäm TsdA/TsdB Fusionsprotein identifiziert werden. Der N-Terminale Bereich der Sequenz hat eine große Homologie zu dem Gen *tint\_2892* (kodiert für TintTsdB) und der C-Terminale Bereich der Aminosäuresequenz besitzt eine große Homologie zu dem Gen *alvin\_0091* (kodiert für AvTsdA). Im Rahmen der Bachelorarbeit von Reuter 2013 wurde das Gen marpuDRAFT\_1194 in einen Expressionsplasmid gebracht, das Protein in *E. coli* BL21-Zellen (+pEC86-Vektor; **Tabelle** 10) produziert und anschließend über His-Tag Affinitätschromatographie aufgereinigt. In der Häm Färbung wurde das Protein mit einer erwarteten Größe von 54,6 kDa nachgewiesen.

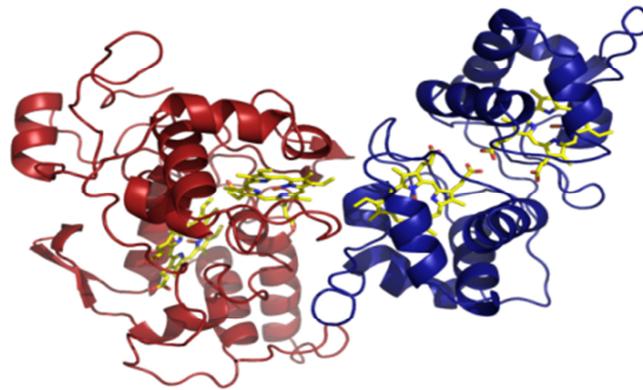
Das Fusionsprotein MarpuTsdA/TsdB konnte über die „Sitting drop“ Methode bei 20 °C kristallisiert werden (Abbildung 53). Kristallographie und Röntgenstrukturanalyse wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Margarida Archer (ITQB, Oeiras; Portugal) von Dr. José durchgeführt. Rekombinant aufgereinigtes Protein wurde mit einer Konzentration von 3,2 mg/mL verwendet und mit 10 % (w/v) PEG 8000, 0,1 M Tris-HCl pH 7,0, 0,2 M MgCl<sub>2</sub> als Fällungsmittel versetzt. Der finale Kristall (Abbildung 53) enthielt noch 0,2 uL Trimethylamin-HCl als Additiv und 25 % Diethylenglykol + 25 % Glycerol + 25 % 1,2 Propandiol wurden als Frostschutzmittel verwendet.



**Abbildung 53:** Kristalle des Fusionsproteins MarpuTsdA/TsdB aus *M. purpuratum*. Die Abbildung wurde von Dr. José Brito zur Verfügung gestellt.

Die Röntgendiffraktometrie wurde am Synchrotron ID29 Beamline in Grenoble (Frankreich) durchgeführt und die Daten von MarpuTsdA/TsdB konnten mit einer Auflösung von 2,74 Å prozessiert werden.

Die Analyse der Struktur ergab, dass beide Häme der TsdB-Homologen Domäne durch His/Met-koordiniert und die Häme der TsdA-Homologen Proteindomäne über His/Met- und His/Cys-koordiniert werden (Abbildung 54).



**Abbildung 54:** Kristallstruktur des Fusionsproteins TsdA/TsdB (Marpu\_1194) aus *M. purpuratum*. Der rote Bereich zeigt die TsdB Domäne, der blaue Bereich die TsdA Domäne des Proteins. Die vier gebundenen *c*-Typ Häme sind in gelb dargestellt. Die Abbildung wurde von Dr. José Brito zur Verfügung gestellt.

## 4. Diskussion

Thiosulfatdehydrogenasen sind innerhalb der Bakterien weit verbreitet und Homologe konnten in allen Familien der Proteobakterien gefunden werden. Die Aktivität der Thiosulfatdehydrogenase konnte in dem Schwefeloxidierer *T. intermedia*, dem chemoorganoheterotrophen *P. stutzeri*, für den schon die Bildung von Tetrathionat beobachtet werden konnte (Schook und Berk 1979), und *Psychrobacter arcticus*, welcher bislang nicht in Bezug auf Energiegewinnung aus Schwefelverbindungen untersucht wurde, nachgewiesen werden (persönliche Kommunikation Johannes Bergmann). Die weite Verbreitung der Thiosulfatdehydrogenase kann eventuell darauf zurückgeführt werden, dass die Bildung von Tetrathionat aus Thiosulfat durch eine spezifische Dehydrogenase durchgeführt werden kann, welche diese Reaktion katalysiert (Sorokin 1993). Im Gegensatz zu der Beobachtung, dass die Möglichkeit Tetrathionat aus Thiosulfat zu bilden mit dem Auftreten eines *tsdA*-Gens sowohl in organotrophen als auch lithotropen Organismen zusammen hängt, behaupten Visser und Kollegen, (Visser et al. 1996) dass die Thiosulfatdehydrogenasen keine gemeinsame Familie bilden. Als Grund für diese Schlussfolgerung werden die katalytischen und strukturellen Unterschiede der Thiosulfatdehydrogenasen herangezogen. Diese Arbeit in Zusammenhang mit der Arbeit von (Müller et al. 2004) weist darauf hin, dass es nur zwei verschiedene Tetrathionat-bildende Enzyme gibt, Chinon-reduzierende Membranenzyme und TsdAs, wie die aus *A. vinosum* oder *C. jejuni* (Denkman et al. 2012; Liu et al. 2013). Die Existenz weiterer Enzymklassen die Tetrathionat bilden, kann jedoch bislang nicht vollständig ausgeschlossen werden.

### 4.1. Struktur der Thiosulfatdehydrogenasen

Die Betrachtung von Thiosulfatdehydrogenasen aus verschiedenen Organismen zeigte, dass es eine begrenzte Heterogenität in der Struktur dieser Enzyme gibt. Die TsdA aus *A. vinosum* liegt als Monomer vor (1.1), während die CjTsdA ein Dimer ausbildet (Kosciow 2011). Eine dimere Form konnte auch für ein homologes Enzym aus *Wolinella succinogenes* gefunden werden (Herresthal 2014). Eine Besonderheit dieses Enzyms ist, dass es vermutlich mit einem Protein, das eine Membranankerdomäne enthält, interagiert (Seel 2012). Einige der strukturellen Unterschiede der TsdA-Proteine können dagegen beseitigt werden, wenn in Betracht gezogen wird, dass viele TsdAs zusammen mit ihrem endogenen Elektronenakzeptor TsdB exprimiert werden. So konnte für das Fusionsprotein TsdA/TsdB aus *M. purpuratum*, sowohl eine Thiosulfatdehydrogenase-, als auch eine Tetrathionatreduktase-Aktivität nachgewiesen werden (Reuter 2013). Die Struktur des

Enzyms lässt auf eine klassische TsdA schließen, die große strukturelle Ähnlichkeiten zu der TsdA aus *A. vinosum* aufweist, mit einer zweiten Domäne, die die Funktion des TsdB übernimmt (Abbildung 54). In *Thiobacillus acidophilus* und *Thiobacillus sp. W5* wurde eine tetramere Thiosulfatdehydrogenase mit jeweils zwei gleichen Untereinheiten  $\alpha_2\beta_2$  identifiziert (Meulenbergh et al. 1992; Visser et al. 1996). Vermutlich bilden zwei TsdA/TsdB-Dimere ein Tetramer in diesen Organismen aus. Auch anhand des Molekulargewichtes der Enzyme, zeigt sich, dass vermutlich starke strukturelle Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen TsdA-Proteinen bestehen. In *A. vinosum* hat das monomere Enzym ein Molekulargewicht von 27,2 kDa (1.1). Homologe Enzyme aus *T. intermedia*, *P. stutzeri* und *P. arcticus* konnten mit einem erwarteten Molekulargewicht von 33,8 kDa, 35 kDa und 33,5 kDa in der Häm Färbung nachgewiesen werden (Siemen 2011; van Helmont 2012; Denkmann et al. 2012). Diese TsdA-Homologen Enzyme werden ohne einen endogenen Elektronenakzeptor exprimiert. Allerdings ist nicht klar, ob die TsdA-Proteine eine monomere oder dimere Form aufweisen. Das TsdA-Homologe Protein Slit1778 aus *Sideroxydans lithotrophicus* kommt eindeutig als Dimer vor und weist ein Gesamtmolekulargewicht von 66 kDa auf (Klein 2012). Eine Untereinheit der ebenfalls dimeren TsdA aus *C. jejuni* besitzt ein Molekulargewicht von 36 kDa (3.5.1; (Kosciow 2011)) und der TsdA-Anteil des Fusionsproteins TsdA/TsdB aus *M. purpuratum* hat eine molekulare Größe von ca. 27 kDa (Reuter 2013). Die TsdA aus *W. succinogenes* ist mit einem Molekulargewicht von 43 kDa etwas größer als die übrigen Enzyme (Seel 2012; Herresthal 2014). Im Wesentlichen kann die Enzymklasse der Thiosulfatdehydrogenasen anhand dieser Beobachtungen in zwei Strukturformen unterteilt werden. Eine Gruppe bilden die TsdA-Proteine, die mit ihrem endogenen Elektronenakzeptor exprimiert werden und als tetramere Form mit jeweils zwei gleichen Untereinheiten ( $\alpha_2\beta_2$ ) vorkommen und eine zweite Gruppe bilden die TsdA-Proteine, die ohne ihren endogenen Elektronenakzeptor exprimiert werden und als Monomer oder Dimer vorkommen. Jedoch können aufgrund der weiten Verbreitung der Thiosulfatdehydrogenasen unter den Bakterien weitere, sich unterscheidende Strukturformen nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Im Besonderen das TsdA-Protein aus *W. succinogenes* beweist, dass die Varianz der TsdA-Strukturen möglicherweise größer ist (Seel 2012; Herresthal 2014).

#### 4.2. Katalytische Aktivität der Thiosulfatdehydrogenasen

pH-Optimum und Temperatur-Optimum der katalytischen Aktivität der TsdA-Proteine sind sehr verschieden und an den jeweiligen Metabolismus des Organismus angepasst.

Zum Beispiel hat die CjTsdA des pathogenen Organismus *C. jejuni* ein Temperatur-Optimum von 42 °C (3.5.3), das vergleichbar mit dem Temperatur-Optimum für das Wachstum von *C. jejuni* ist, während für die AvTsdA ein Temperatur-Optimum von 30 °C bestimmt wurde, das den optimalen Wachstumsbedingungen des Schwefeloxidierers *A. vinosum* entspricht (1.5). Die Thiosulfatdehydrogenase aus *T. intermedia* kann innerhalb einer großen Temperaturspanne optimal funktionieren und hat ihre maximale katalytische Aktivität bei einem pH-Wert von 3,0 (Siemen 2011). Das Enzym ist damit bestens an die sauren Umwelteinflüsse des Schwefeloxidierers angepasst (Wentzien 2002; Wentzien und Sand 2004).

Die AvTsdA kann mit einer hohen katalytischen Effizienz von  $12.727 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bei pH 4,0 und  $14.000 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bei pH 5,0 Thiosulfat zu Tetrathionat umsetzen. Die kinetische Analyse konnte dabei nicht über Michaelis-Menten Kinetik erfolgen, da zwei Moleküle desselben Substrates zu einem Molekül Produkt umgesetzt werden, weshalb eine Interpretation der Ergebnisse nach Hill erfolgte (Segel 1993). Auffällig ist dass die maximale spezifische Aktivität der TsdA bei pH 4,0 mit Ferricyanid als artifiziellem Elektronenakzeptor liegt, die Substrataffinität jedoch bei pH 5,0 höher ist (Tabelle S 1).

Die Reduktion von Tetrathionat kann das Enzym aus *A. vinosum* vergleichsweise wenig effizient katalysieren. Der  $k_{\text{cat}}/S_{[0,5]}$ -Wert beträgt für die Tetrathionat-abhängige Oxidation von reduziertem Methylviologen gerade einmal  $18,7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und ist damit 700-fach niedriger, als der vergleichbare Wert für Thiosulfatdehydrogenase-Aktivität durch das Protein (Tabelle 17). Die TsdA aus *A. vinosum* fungiert eindeutig als Thiosulfatdehydrogenase und nicht als Tetrathionatreduktase (Liu et al. 2013).

Für das TsdA-Homologe Protein aus *T. intermedia* konnte eine sehr hohe, maximale spezifische Aktivität bei der Umsetzung von Thiosulfat mit einem  $V_{\text{max}}$  von 121.000 U/mg bei einem pH-Wert von 3,0 gemessen werden. Bei einem leicht sauren pH-Wert von 5,0 war die Aktivität ca. 2,5-fach geringer und bei pH 7,0 war das Protein katalytisch inaktiv (Denkman et al. 2012). Die TsdA aus *P. stutzeri* wies dagegen eine ähnlich hohe Aktivität, wie das Protein aus *A. vinosum*, mit einem  $V_{\text{max}}$ -Wert von 31.000 U/mg bei pH 4,2, auf (van Belmont 2012). Es konnte keine signifikante Aktivität bei pH 7,0 nachgewiesen werden und das Temperatur-Optimum der Reaktion lag bei 20 °C, wobei die Aktivität um jeweils ein Drittel geringer bei Temperaturen von 30 °C und 9 °C war (Denkman et al. 2012; van Belmont 2012). Eine sehr hohe Substrataffinität mit einem  $S_{[0,5]}$ -Wert von 25  $\mu\text{M}$  für das TsdA-Homologe Enzym aus *P. stutzeri* spricht ebenfalls für eine Funktion

als Thiosulfatdehydrogenase (van Helmont 2012). Allerdings muss die Fähigkeit zur Reduktion von Tetrathionat noch untersucht werden, um eine Bifunktionalität dieser TsdA-Proteine ausschließen zu können.

**Tabelle 17: Vergleich der Thiosulfatdehydrogenase- und Tetrathionatreduktase-Aktivität von ausgewählten TsdAs aus verschiedenen Organismen**

Reaktion pH	Thiosulfat --> Ferricyanid				Tetrathionat --> Methylviologen				Referenz
	pH 4.0				pH 5.0				
Parameter	$V_{\max}$	$k_{\text{cat}}$	$S_{[0.5]}$	$k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$	$V_{\max}$	$k_{\text{cat}}$	$S_{[0.5]}$	$k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$	
Organismus/Einheit	U mg <sup>-1</sup>	s <sup>-1</sup>	mM	mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	U mg <sup>-1</sup>	s <sup>-1</sup>	mM	mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	
<i>A. vinosum</i>	28600±2500	14.000	1,10	12727,3	82±3,4	37,0	1,98	18,7	Liu et al. 2013
<i>C. jejuni</i>	990±42	604	2,00	302,0	64±1,1	42,6	0,01	4260,0	Liu et al. 2013
<i>M. purpuratum</i>	2871±220	2.753	0,26	10589,0	8621±402,0	8270,0	1,00	8270,0	Reuter 2013
<i>W. succinogenes</i>	22±2	15	4,3	3,6	-	-	-	-	Herresthal 2014

In Tabelle 17 ist die Thiosulfatdehydrogenase- und Tetrathionatreduktase-Aktivität von TsdA-Proteinen aus verschiedenen Organismen dargestellt. Im Vergleich zu AvTsdA, ist die TsdA aus *C. jejuni* mit einer ca. 42-fach geringeren katalytischen Effizienz eine schwache Thiosulfatdehydrogenase (Tabelle 16). Sowohl die Substrataffinität als auch die katalytische Effizienz weisen auf eine primäre Funktion des Enzyms als Tetrathionatreduktase hin. Dennoch konnte eine katalytische Effizienz von 302 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> für die Thiosulfatdehydrogenase-Aktivität der CjTsdA bestimmt werden, was auf eine Bifunktionalität des Proteins schließen lässt. Nur wenige andere Bakterien können bifunktional Thiosulfat oxidieren und Tetrathionat reduzieren, einige Beispiele finden sich in verschiedenen Pseudomonaden-Stämmen (Trudinger 1967; Tuttle 1980). In dem marinen *Pseudomonas 16B* wurde das *c*-Typ Cytochrom Thiosulfat-Oxidase nachgewiesen, welches auch Tetrathionat reduzieren konnte und beide Funktionen als reversible Aktivitäten desselben Enzyms interpretiert (Whited und Tuttle 1983). In *M. purpuratum* konnte eine Thiosulfatdehydrogenase-Aktivität mit einer maximalen spezifischen Aktivität  $V_{\max}$  von 2871 U/mg, bei einem pH-Wert von 6,0 unter einer Zugabe von 200 mM Natriumchlorid, festgestellt werden. Ähnlich wie CjTsdA konnte MarpuTsdA/TsdB, mit einer deutlich höheren spezifischen Aktivität von 8621 U/mg, Tetrathionat reduzieren und dabei Methylviologen als Elektronendonator nutzen (Tabelle 17). Eine sehr schwache Thiosulfatdehydrogenase-Aktivität mit einem  $V_{\max}$ -Wert von 22 U/mg und einer katalytischen Effizienz  $k_{\text{cat}}/S_{[0.5]}$  von 3,6 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> konnte für die TsdA aus *W. succinogenes* bestimmt werden (Tabelle 17). Eine genaue Bestimmung der Tetrathionatreduktion steht bei diesem Enzym

noch aus, aber in ersten Tests mit reduziertem Methylenblau als Elektronendonator, konnte, eine im Vergleich zur Thiosulfatdehydrogenase-Aktivität, deutlich höhere Aktivität gemessen werden (Seel 2012). Ebenfalls eine schwache Aktivität bei der Umsetzung von Thiosulfat konnte für die lösliche *E. coli* Fraktion, die die rekombinante TsdA aus *P. arcticus* enthielt, mit einem  $V_{\max}$ -Wert von 33,4 U/mg Protein bei pH 4,2 und einem Temperatur Optimum von 20 °C bestimmt werden (Denkman et al. 2012). Damit ist diese TsdA ebenfalls ein Kandidat für ein bifunktionales Enzym mit der primären Fähigkeit zur Reduktion von Tetrathionat.

Auf der Basis der untersuchten Enzyme, können diese, ähnlich wie bei der strukturellen Unterteilung der TsdA-Proteine, auch katalytisch in zwei Klassen aufgeteilt werden. Eine Klasse bilden die TsdA-Proteine, die als primäre Funktion Thiosulfat oxidieren wie zum Beispiel das Enzym aus *A. vinosum* und vermutlich auch die TsdA-Homologen Proteine aus *T. intermedia* und *P. stutzeri*. Eine weitere Klasse bilden die TsdA-Proteine, die bifunktional Thiosulfat oxidieren und Tetrathionat reduzieren können mit einer primären Funktion als Tetrathionatreduktase wie zum Beispiel die CjTsdA und das Fusionsprotein TsdA/TsdB aus *M. purpuratum*.

### 4.3. Analyse der biochemischen Charakteristika von Häm 1

Die erhaltene Struktur der TsdA aus *A. vinosum* bestätigte die Vermutung, dass es sich bei Häm 1 um ein „low-spin“ hexakoordiniertes Häm mit einem proximalem Histidin-Liganden und einem distalen Cystein-Liganden handelt (3.1.1) und komplettiert damit Ergebnisse der EPR Spektroskopie (Denkman et al. 2012). Eine starke Konservierung des Cystein<sub>96</sub> innerhalb der Enzymklasse der TsdA-Proteine (1.1) spricht dafür, dass das Cystein auch in TsdA-Proteinen aus anderen Organismen den distalen Liganden des Häm 1 bildet. Für das Fusionsprotein TsdA/TsdB aus *M. purpuratum* konnte diese Funktion bereits nachgewiesen werden (3.7), was die Vermutung erhärtet, dass es sich bei der Ligation von Häm 1 um eine strukturelle Gemeinsamkeit aller TsdA-Proteine handelt. Die Thiosulfatdehydrogenasen reihen sich in die Liste der Proteine mit ungewöhnlicher His/Cys-Koordination des Häm-Eisen ein, zu der unter anderem das SoxXA-Protein von *Rhodovulum sulfidophilum* (Cheesman et al. 2001), das DsrJ-Protein von *A. vinosum* (Grein et al. 2010), das grüne Häm-Protein von *Halochromatium salexigens* (van Driessche et al. 2006) und das PsbV2-Cytochrom des Cyanobakteriums *Thermosynechococcus elongates* gehören (Suga et al. 2013). Wie für das DsrJ-Protein konnte auch für die TsdA keine Persulfurierung nachgewiesen werden. Außer der His/Cys-Ligation

eines Hämes verbinden die Gruppe dieser Proteine nur wenige bisher bekannte funktionelle oder strukturelle Gemeinsamkeiten (4.1 und 4.2). Allerdings wird vermutet, dass diese Art der Häm-Koordination unter anderem eine Rolle bei Enzymen spielt, die Reaktionen katalysieren in denen anorganische Schwefelkomponenten involviert sind (Grein et al. 2010). Am besten erforscht ist diese Art der Häm-Ligation bei den SoxXA-Proteinen. Die katalytische Untereinheit von SoxA ist ein Dihäm Cytochrom in *Rhodovulum sulfidophilum* und *Paracoccus pantotrophus* (Cheesman et al. 2001; Roth und Friedrich 2002), während in *Starkeya novella* und *Chlorobaculum tepidum* das erste Häm von SoxA nicht vorhanden ist (Kappler et al. 2004; Ogawa et al. 2008). Eine His/Cys-Ligation des zweiten Hämes konnte in allen SoxA-Proteinen nachgewiesen werden (Cheesman et al. 2001; Bamford et al. 2002; Roth und Friedrich 2002; Kappler et al. 2004; Ogawa et al. 2008). Das zweite Häm von SoxXA korrespondiert zu dem ersten Häm von TsdA auf der Ebene der Aminosäuresequenz und auch der N-Terminale Bereich von TsdA scheint zu dem Protein SoxA verwandt zu sein (Denkmann et al. 2012).

Für die SoxXA-Proteine konnte gezeigt werden, dass Häme mit Histidin/Cystein-Ligation ein sehr niedriges Redoxpotential haben. Das SoxXA aus *Paracoccus pantotrophus* besitzt ein His/Cys-koordiniertes Häm mit einem Potential von  $-426$  mV. Allerdings liegt das Cystein in der SoxA-Domäne des Proteins persulfuriert vor, was das Redoxpotential zusätzlich verringert, da das Persulfid die anionische Form der Sulfhydrylgruppe stabilisiert (Cheesman et al. 2001; Reijerse et al. 2007). Ein gutes Beispiel dafür liefert das SoxXA-Protein aus *Rhodovulum sulfidophilum*, das je ein Häm mit His/Cys-, His/CysS<sup>-</sup>- und His/Met-Koordination enthält. Das Cystein-koordinierte Häm besitzt ein Redoxpotential von  $-340$  mV und das Häm, das durch ein persulfuriertes Cystein koordiniert wird, ein Redoxpotential von  $-400$  mV (Bradley et al. 2012). Ein noch niedrigeres Redoxpotential konnte für das SoxA-Protein aus *Starkeya novella* festgestellt werden mit einem Wert von  $-479$  mV (Kappler et al. 2008). Insgesamt zeigt sich am Beispiel der SoxA-Proteine, dass His/Cys-koordinierte Häme ein negatives Redoxpotential aufweisen. Die Bestimmung des Redoxpotentials der AvTsdA ergab die beiden Werte  $-150$  mV und  $+50$  mV für die Häme der Thiosulfatdehydrogenase (3.1.2). Das Histidin/Cystein koordinierte Häm 1 hat mit großer Wahrscheinlichkeit das deutlich niedrigere Redoxpotential von  $-150$  mV. Im Vergleich zu den SoxA-Proteinen, kann ein Potential von  $-150$  mV für ein His/Cys-koordiniertes Häm in der Thiosulfatdehydrogenase als eher positiv eingeschätzt werden.

Über die Aufnahme von UV-Vis Spektren konnte ein Hinweis auf Redox- und pH-abhängige Veränderungen der His/Cys-Koordination gefunden werden, die sich auf das Potential des Hämes auswirken können. So führte eine Veränderung des pH-Wertes, besonders in Spektren des reduzierten Zustandes des Proteins, zu starken Unterschieden in der Intensität und Wellenlänge (416,6 bei pH 5,0 zu 419,6 nm bei pH 8,0) des Soret-Peaks (Abbildung 16). Diese Veränderungen in der Soret-Peak Region sind eventuell auf Änderungen des Protonierungsstatus von einem Thiol-gebundenen Häm zurück zuführen. Redoxtransformationen in Cystein ligierten Hämen sind oftmals begleitet durch Protonierungen oder Deprotonierungen des Cystein Liganden (Zhong et al. 2014). Allerdings stellten Zhong und Kollegen eine Abnahme der Absorptionsintensität des Soret-Peaks bei einer Abnahme des pH-Wertes fest, genau umgekehrt, zu den für TsdA gemachten Beobachtungen. Die Verringerung der Absorptionsintensität des Soret-Peaks bei einem höheren pH-Wert weist auf die Präsenz eines stärkeren Feldliganden des Häm-Eisens hin (Girvan et al. 2006). Bei einem niedrigeren pH-Wert ist das Cystein-Thiolat vermutlich protoniert und das Cystein-Thiol ist ein schwächerer Ligand für das Häm (Zhong et al. 2014). In Spektren des oxidierten Zustandes ändert sich das Absorptionsmaximum des Soret-Peaks nicht, sondern verbleibt sogar bei pH 8,0 bei 406 nm, was auf einen Verbleib der Thiolat-Ligation hindeutet. Die spezifischere Bindung des Substrates Thiosulfat bei einem höheren pH-Wert ist eventuell auch ein Hinweis auf einen unterschiedlichen Protonierungsgrad des Cysteins (3.1.4). Bei pH 5,0 liegt das Cystein, das den distalen Liganden von Häm 1 bildet, vermutlich in weniger Fällen als Thiolat vor, was eine bessere Bindung des Substrates ermöglichen würde. Eine Beteiligung des Cysteins an der Substratbindung konnte allerdings noch nicht nachgewiesen werden.

Der bedeutendste Unterschied in Spektren des oxidierten AvTsdA ist ein Peak bei 634 nm, der bei pH 6,5 und pH 8,0 (Abbildung 19) und besonders deutlich im Spektrum des teil-reduzierten Proteins, hervorgerufen entweder durch die Zugabe von Thiosulfat oder geringen Konzentrationen an Natriumdithionit, auftritt (Abbildung 20). Im Spektrum des oxidierten Zustandes beider TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten konnte ein Peak bei 620 nm beobachtet werden, welcher dann in Spektren des teil-reduzierten Zustandes (durch die Zugabe von 8 mM Thiosulfat) nach 634 nm verschoben wurde (3.3.4). Dieser Peak in den Spektren des Wildtyp-Proteins und der TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten ist auf jeden Fall auf Veränderungen an Häm 1 zurückzuführen, da für keine der TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten ein Absorptionsmaximum bei 634 nm festgestellt werden konnte (3.2.2). Im teil-reduzierten Zustand kann dieser Peak vermutlich auf das vorübergehende Auftreten von „high-spin“

Häm hinweisen, das durch Bewegung des Cystein<sub>96</sub> aus der Eisen-Koordinationsphäre entsteht (Pettigrew und Moore 1987; Miles et al. 1993). Allerdings wies die TsdA-Cystein<sub>96</sub>-Variante TsdAC<sub>96</sub>G keinen Peak bei 634 nm auf und Glycin ist nicht in der Lage das Häm-Eisen zu koordinieren, weshalb ein pentakoordiniertes Häm als sehr wahrscheinlich gilt. In Betracht gezogen werden muss deshalb auch eine Interpretation als Ladungstransferbande einer Cystein-Thiolat Ligation des Häm-Eisen. Charakteristisch für ein Cystein-Thiolat wären auch ein ausgeprägter  $\delta$ -Peak, sowie das Auftreten eines zweiten Absorptionsmaximums oberhalb von 700 nm (Marvin et al. 2008). Diese Charakteristika konnten in Spektren des TsdA Wildtyp-Proteins nicht beobachtet werden. Dennoch scheint im Zusammenhang mit der Intensitätsänderung des Soret-Peaks in Abhängigkeit vom pH-Wert, welche auch auf ein Thiolat hinweist, diese Interpretation wahrscheinlicher. Ein weiteres Charakteristikum der TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten ist das Auftreten eines Absorptionsmaximums bei 660 nm in Spektren des reduzierten Zustandes der Proteine. Dieser Peak ist ein Indikator für einen Ladungstransfer, welcher durch den Austausch des Cysteins auftritt (Marvin et al. 2008). Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass dieses Absorptionsmaximum auch durch eine Interaktion der Proteine mit Natriumdithionit zu Stande kommt, die nur bei den TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten durch eine strukturelle Änderung dieser Proteine möglich ist. Das schwefelhaltige Reduktionsmittel Natriumdithionit kann einen Einfluss auf das UV-Vis Spektrum haben, indem es mit den Proteinen interagiert und so Absorptionsmaxima oberhalb von 600 nm hervorruft. Abhilfe könnte die Verwendung eines anderen Reduktionsmittels verschaffen wie z. B. Europium, welches als Reduktant ohne Schwefelgruppe nicht für die Bildung von Komplexen bekannt ist. Allerdings ist Europium ein weniger starkes Reduktionsmittel und muss in vielen Fällen zunächst mit EDTA versetzt werden, um eine vollständige Reduktion zu ermöglichen (Vincent et al. 2003).

Eine umfassende spektrale Analyse der TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten zeigte, dass das Häm 1 bei einem Austausch des Cysteins durch die Aminosäuren Histidin oder Methionin, diese die Funktion als distaler Ligand übernehmen. In den Spektren der oxidierten Proteine der TsdA-Varianten TsdAC<sub>96</sub>H und TsdAC<sub>96</sub>M war der Soret-Peak deutlich zu einer höheren Wellenlänge verschoben im Vergleich zum TsdA Wildtyp-Protein (Tabelle 14). Eine Verschiebung des Soret-Peaks in den langwelligeren Bereich weist auf den Austausch eines schwachen Feldliganden zu einem stärkeren Feldliganden hin (Girvan et al. 2006). Die Aminosäuren Histidin und Methionin sind in der Lage das Häm Eisen zu koordinieren und ersetzen Cystein als Liganden von Häm 1. Weitere auffällige spektrale Charakte-

ristika der TsdAC<sub>96</sub>M-Variante sind eine hohe Intensität des  $\alpha$ -Peaks im Vergleich zu den anderen Proteinen und einen signifikant höheren Quotienten von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peak (Tabelle 14; 3.2.2). Diese veränderten spektralen Eigenschaften könnten ebenfalls eine Methionin-Ligation des Hämes anzeigen. Dagegen spricht allerdings, dass kein für eine His/Met-Ligation eines Hämes charakteristischer Peak bei 695 nm beobachtet werden konnte (Miles et al. 1993). Allerdings weisen einige Cytochrome mit His/Met-Koordination des Häm-Eisens kein Absorptionsmaximum bei dieser Wellenlänge auf (Zhong et al. 2014).

Neben der umfassenden Analyse zu den Eigenschaften der Häm 1-Koordination der TsdA aus *A. vinosum*, konnten auch schon erste Erkenntnisse über das TsdA-Homologe Protein aus *C. jejuni* gewonnen werden. Die CjTsdA wies für ein *c*-Typ Cytochrom typische, spektrale Charakteristika auf (Abbildung 48). Das Spektrum wurde von einem „low-spin“ *c*-Typ Häm dominiert und ein Absorptionsmaximum bei 625 nm im Spektrum des oxidierten Proteins kann eventuell einem kleinen Anteil von Häm im „high-spin“ Zustand zugeordnet werden (Miles et al. 1993). Wahrscheinlicher ist aber, dass dieser Peak charakteristisch für ein Cystein(Thiolat) ist (Marvin et al. 2008), wie dies schon für die TsdA aus *A. vinosum* festgestellt werden konnte (s. o.). Erste Ergebnisse aus der UV-Vis Analyse der TsdA aus *W. succinogenes* weisen ebenfalls auf ein Cystein(Thiolat) an Häm 1 hin (Herresthal 2014). Für das Fusionsprotein TsdA/TsdB konnte bisher kein Hinweis auf ein Cystein(Thiolat) gefunden werden (Reuter 2013). Eine Beobachtung des Cystein(Thiolats) in Vertretern der  $\gamma$ - und  $\epsilon$ -Proteobakterien (*A. vinosum* und *C. jejuni*) könnte auf eine konservierte Eigenschaft von Häm 1 unter den TsdA-Proteinen schließen lassen.

#### 4.4. Funktion von Häm 1

Das His/Cys-koordinierte Häm der TsdA aus *A. vinosum* hat ein negatives Redoxpotential, was eine nicht katalytische Funktion des Hämes vermuten lässt, da dem Redoxpaar Thiosulfat/Tetrathionat bislang ein positives Potential zugeordnet wurde, dessen genauer Wert allerdings höchst umstritten ist. Im Jahr 1977 wurde von Thauer und Kollegen ein Potential für das Redoxpaar Thiosulfat/Tetrathionat  $E^0$  von + 24 mV (Thauer et al. 1977) bestimmt, 1972 konnte dagegen ein Potential  $E^0$  von + 170 mV ermittelt werden (Kaprálék 1972) und schon 1952 wurde ein Potential  $E^0$  von + 80 mV veröffentlicht (Latimer 1952). Eine genaue Aussage über den tatsächlichen Wert des Potentials von  $S_2O_3^{2-}/S_4O_6^{2-}$  kann auf Basis dieser Daten nicht gemacht werden. Das Cystein-ligierte Häm wäre vermutlich bei einem positiven Potential des Redoxpaares  $S_2O_3^{2-}/S_4O_6^{2-}$  nicht in der

Lage die Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat zu katalysieren. Im Gegensatz dazu war eine Teilreduktion der TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten durch Thiosulfat nicht möglich. Die kinetische Analyse ergab zudem, dass keinerlei enzymatische Aktivität ohne das Cystein<sub>96</sub> möglich ist. Das Cystein<sub>96</sub> ist also essentiell für die enzymatische Aktivität der TsdA (Denkmann et al. 2012). Eine mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt könnte die Instabilität der TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten sein, bei denen ein proteolytisches Abbauprodukt bei ca. 15 kDa im SDS-Gel sichtbar war (3.2.1). Erst durch einen zweiten Aufreinigungsschritt, die Gelfiltration, konnten die Proteine ähnlich „rein“ wie das TsdA Wildtyp-Protein erhalten werden (Tabelle 13). Das Cystein<sub>96</sub> scheint als Ligand von Häm 1 auch eine stabilisierende Funktion für das Protein zu haben. Häm-Liganden können entscheidend für die Stabilität des Proteins sein. Für Pferdeherz Cytochrom *c* konnte bereits die unterschiedliche Stabilität verschiedener Varianten, in denen unter anderem der distale Häm Ligand ausgetauscht wurde, des Proteins gezeigt werden. Der Austausch eines proximalen oder distalen Häm Liganden in einem Cytochrom kann zu Konformationsänderungen des Proteins führen, welche die Stabilität nachhaltig beeinträchtigen (Cherney und Bowler 2011). Auch die Umgebung der Häm-Liganden spielt eine wichtige Rolle für die Stabilität der Bindung dieser und auch der des Proteins. Am Beispiel von Myoglobin konnte gezeigt werden, dass die Umgebung des proximalen und distalen Liganden im Protein einen Einfluss auf den Spin-Status und die Stabilität der Bindung haben kann (Roach et al. 1999). Sollte ein Austausch des distalen Liganden die Struktur der Umgebung verändern kann sich dies wiederum auf die Eigenschaften der Bindung auswirken. In *C. jejuni* 81116 konnte ein zweites TsdA-Homolog, das Protein C8j\_0040, identifiziert werden, das kein konserviertes Cystein enthält. Dieses Protein hatte im Gegensatz zu den TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten eine sehr geringe Thiosulfatdehydrogenase und Tetrathionatreduktase-Aktivität. Auffällig war aber, dass C8j\_0040 ähnlich wie die TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten schwer in „reiner Form“ aufzureinigen war, was die These für eine stabilisierende Funktion des Cysteins innerhalb der TsdA-Proteine stützt. Hierbei muss allerdings bedacht werden, dass es sich bei C8j\_0040 um keine Variante einer TsdA handelt und eventuell ein Cystein für die Funktionalität dieses Proteins keine Rolle spielt. Erste Ergebnisse aus der potentiometrischen Cyclovoltametrie zur TsdA aus *C. jejuni* weisen auch darauf hin, dass Häm1 vermutlich eine nicht katalytische Funktion innerhalb des Proteins zugeordnet werden kann (persönliche Kommunikation Julia Kurth). Insgesamt hat das Cystein auf jeden Fall eine stabilisierende Funktion innerhalb der TsdA. Ein Austausch dieser Aminosäure könnte zu Konformationsänderungen an dem Protein, die

zum Beispiel die Struktur des Substratkanals beeinträchtigen können, und so eine katalytische Aktivität von AvTsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten verhindern, führen. In Betracht gezogen werden muss dennoch auch die Möglichkeit einer katalytischen Funktion des Häm 1. Besonders aufgrund des unklaren Potentials für das Redoxpaar Thiosulfat/Tetrathionat und der vollständigen Inaktivität der TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten, kann eine katalytische Funktion neben der nachgewiesenen stabilisierenden Funktion des Häm 1 nicht ausgeschlossen werden. In diesem Fall könnte die TsdA einen ähnlichen Mechanismus wie die SoxA-Proteine aufweisen, in denen als katalytisch aktives Zentrum ein His/Cys-koordiniertes Häm, mit sehr niedrigem Redoxpotential, fungiert (Kappler et al. 2008). Die Sequenz der TsdA-Proteine, ähnlich wie die der SoxA-Proteine, enthält ein hoch konserviertes Arginin (Abbildung 2), das auf eine derartige Thiocystein-S-Sulfat-Bindung polarisierend wirken könnte und sich in der direkten Umgebung des konservierten Cysteins befindet. Allerdings konnte ein Thiocystein-S-Sulfat Intermediat, wie bei den SoxA-Proteinen (Bamford et al. 2002), noch für keine TsdA nachgewiesen werden. Um eine katalytische Funktion des Häm 1 ausschließen oder bestätigen zu können, sind eine Kristallstruktur aktiver TsdA-Proteine (TsdA mit Thiosulfat oder Tetrathionat) sowie weitere Versuche zur Redoxchemie dieser Proteine nötig.

#### 4.5. Analyse der biochemischen Charakteristika von Häm 2

Aus der gewonnenen Struktur lässt sich eine His/Lys-Ligation des Hämes im oxidierten Zustand der TsdA aus *A. vinosum* ableiten (3.1.1). Im Gegensatz zu Häm 1, zeigt die Sequenz des C-Terminalen Bereiches, in dem das Häm 2 sich befindet, keinerlei Ähnlichkeiten zu den SoxA-Proteinen (Denkman et al. 2012). Während in der Stickstoffreduktase von *Wolinella succinogenes* Lysin als proximaler Ligand im CXXCK Motiv fungiert (Einsle 2000), nimmt Lysin in der AvTsdA die Funktion als distaler Ligand wahr. Bisher konnte eine solche Ligation nur im Pferdeherz Cytochrom *c* bei einem alkalischen pH-Wert beobachtet werden (Schweitzer-Stenner et al. 2007; Verbaro et al. 2009). Auch für die Thiosulfatdehydrogenase war diese Art der Häm-Koordination nicht zu erwarten, da das Lysin nicht konserviert vorliegt und in den meisten TsdA-Homologen Proteinen an dieser Stelle in der Aminosäuresequenz ein Asparagin vorliegt (3.3), wie zum Beispiel in der CjTsdA. Asparagin konnte schon als distaler Ligand für das Cytochrom *c* SHP aus *R. sphaeroides* nachgewiesen werden (Leys 2000) und eine Funktion als distaler Ligand kann deshalb für diese Aminosäure nicht ausgeschlossen werden. Allerdings war bei einem Austausch der Aminosäure Lysin durch Asparagin in der AvTsdA-Variante

TsdAK<sub>208</sub>N keine His/Asn-Koordination des Häm-Eisen im oxidierten Zustand festzustellen, sondern als distaler Ligand von Häm 2 fungierte das Methionin<sub>209</sub>. Ein weiterer Kandidat für die Funktion als distaler Ligand von Häm 2 in CjTsdA ist das Lysin<sub>255</sub>, das unter den TsdA-Proteinen stark konserviert ist (Abbildung 47). Diese Aminosäure könnte auch in der TsdA aus *W. succinogenes* als distaler Ligand fungieren, da hier in der Sequenz, an Stelle des Lysin in *A. vinosum* oder Asparagin in *C. jejuni*, ein Threonin vorliegt (Herresthal 2014). Threonin ist, ähnlich wie Glycin, nicht in der Lage als Ligand des Häm-Eisen zu fungieren.

Im reduzierten Zustand der AvTsdA ist das zweite Häm über Histidin und Methionin koordiniert (3.1.1). Aufgrund der ähnlichen spektralen Charakteristika der CjTsdA im Vergleich zum Protein aus *A. vinosum* und einer Teilreduktion des Enzyms im aufgereinigten Zustand, die auf ein hohes Redoxpotential der CjTsdA schließen lässt, ist eine Methionin-Ligation eines Hämes auch hier wahrscheinlich (3.5.2). Eine Methionin-Ligation ist nicht ungewöhnlich, da diese Art der Häm-Eisen-Koordination vergleichsweise häufig vorkommt (Cheesman et al. 2001) und geht immer mit einem vergleichsweise hohen Redoxpotential einher (Reijerse et al. 2007). Erste Ergebnisse aus der potentiometrischen Bestimmung des Redoxpotentials weisen darauf hin, dass es auch in CjTsdA einen Redox-abhängigen Wechsel des Liganden an Häm 2 gibt (persönliche Kommunikation Julia Kurth). Ein Ligandenwechsel, ähnlich wie bei der AvTsdA, von einer His/Lys- zu einer His/Met-Koordination an Häm 2, kann in CjTsdA nur stattfinden, wenn Lysin<sub>255</sub> als distaler Ligand fungiert. Auch die Möglichkeit eines Redox-abhängigen, Wechsel des Liganden von Asparagin zu Methionin besteht.

Ein Ligandenwechsel von einem His/Lys-koordinierten Häm zu einem His/Met-koordinierten Häm konnte bislang nicht nachgewiesen werden, ebenso wie ein Redox-abhängiger Wechsel der Ligation von einer His/Asn- zu einer His/Met-Koordination eines Hämes. In dem Cytochrom *c* SHP von *Rhodobacter sphaeroides* wurde ein Ligandenwechsel von Aspartat im oxidierten Zustand zu einer Wasserstoffbrückenbindung (Pentakoordination des Hämes) im reduzierten Zustand aufgezeigt (Leys 2000). Für Pferdeherz Cytochrom *c* konnte die zur AvTsdA umgekehrte Richtung des Ligandenwechsels von einer His/Met- zu einer His/Lys-Koordination eines Hämes beobachtet werden, allerdings nur in Kombination mit einer Änderung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich (Schweitzer-Stenner et al. 2007; Verbaro et al. 2009). Ein Redox-abhängiger Ligandenwechsel wurde im Transkriptionsregulator RcoM-2 von *Burkholderia xenovorans* festge-



koordinierte Häme sind nicht ungewöhnlich und weit verbreitet. Der Hämoglobin-Binderezeptor von *Neisseria meningitidis* enthält in seinem oxidierten Zustand ein pentakoordiniertes Häm (Mokry et al. 2014) und das Protein MauG, welches TTQ (Tryptophan Tryptophylchinon) generiert, enthält ebenfalls ein Häm im „high-spin“ Status als Cofaktor (Yukl et al. 2013). Dennoch war ein pentakoordiniertes Häm in diesem Fall nicht zu erwarten, da bei einer Strukturanalyse der TsdA-Variante TsdAK<sub>208</sub>N die Aminosäure Methionin<sub>209</sub> als distaler Ligand des zweiten Hämes fungiert, während die His/Cys-Koordination von Häm 1 bestehen blieb (3.3.2). Wichtig ist festzuhalten, dass bei beiden TsdA-Lysin<sub>208</sub>-Varianten die Ligation des Cysteins an Häm 1 bestehen blieb, eine mögliche Konformationsänderung der Proteine durch den Austausch des Lysins, beeinflusst nicht die Häm-Eisen Koordination an Häm 1.

Das Redoxpotential der Population der His/Lys- und His/Met-koordinierten Häme der AvTsdA hat wurde mit + 50 mV bestimmt (3.1.2). Bis jetzt wurde noch in keinem Protein für ein Häm mit einer His/Lys-Koordination ein Redoxpotential bestimmt. Häme, die durch ein Methionin koordiniert werden, weisen in der Regel ein stark positives Redoxpotential auf (Cheesman et al. 2001). Zum Beispiel konnte für das SoxXA-Protein aus *Paracoccus pantotrophus* ein Potential von + 189 mV für das His/Met-koordinierte Häm festgestellt werden (Reijerse et al. 2007). In dem SoxXA-Protein von *Rhodovulum sulfidophilum* wurde sogar ein Redoxpotential von + 210 mV gemessen (Bradley et al. 2012). Diese Potentiale liegen weit oberhalb des hier bestimmten Redoxpotentials von + 50 mV für das zweite Häm der TsdA, weshalb anzunehmen ist, dass das Redoxpotential im reduzierten Zustand höher liegt und durch die Koordination des Lysins im oxidierten Zustand des Proteins das Gesamtpotential der Häm-Populationen verringert wird. Die Bestimmung des Redoxpotentials von Häm 2 ergab die Potentiale + 20 mV und + 80 mV (3.1.2). Vermutlich kann demnach das niedrigere Potential von +20 mV dem His/Lys koordinierten Häm 2 und das höhere Potential von + 80 mV dem His/Met-koordinierten Häm 2 zugeordnet werden. Für Pferdeherz Cytochrom *c* konnte bereits 1989 gezeigt werden, dass der Wechsel des distalen Liganden von einer His/His-Koordination zu einer His/Met-Koordination des Hämes einen Anstieg des Redoxpotentials um + 100 mV zur Folge hatte (Raphael und Gray 1989). Ein Anstieg des Potentials um + 60 mV im Zuge eines Ligandenwechsels von His/Lys- nach His/Met-Koordination ist wahrscheinlich und beide Potentiale zusammen ergeben ein Redoxpotential von + 50 mV und damit genau den Wert, der als ungefähres Potential für Häm 2 über eine Zinnoxidelektrode bestimmt worden ist (3.1.2). Durch die Änderung des Potentials bei einem Wechsel des Liganden

im reduzierten Zustand ist eine Reoxidation des Proteins schwieriger und es wird von einer Hysterese gesprochen.

Die „Hard-Soft-Acid-Base“ Theory (HSAB-theory) sagt vorher, dass „harte“ Basen wie Cysteinat bevorzugt das oxidierte Eisen (FeIII) stabilisieren, was zu einem negativen Reduktionspotential führt. Im Gegensatz dazu, stabilisieren „weiche“ Liganden, wie Methionin das reduzierte Eisen (FeII) was zu einem positiven Shift des  $E_m$ -Wertes führt. Die Oxidation von Methionin-koordiniertem Häm-Eisen ist deutlich schwieriger (Pearson und Songstad 1967). Diese Theorie passt auch auf das Redoxverhalten der AvTsdA und zeigt, dass die Hysterese auf den Wechsel des Liganden an Häm 2 im Protein zurück zu führen ist.

Eine Hysterese konnte auch schon für das Cytochrom *cd1* von *Paracoccus pantotrophus* beobachtet werden (Koppenhöfer et al. 2000) oder in der Membrananker-Domäne der SuccinatChinon-Oxidoreduktase von *Bacillus subtilis* (Christenson et al. 2008). Im Falle des Cytochroms *cd1* ist die Ursache der Hysterese ein Ligandenwechsel von einer His/His- zu einer His/Met-Koordination des *c*-Typ Hämes (van Wonderen et al. 2007; Koppenhöfer et al. 2000). Eine Hysterese unter Beteiligung einer His/Lys-Ligation konnte bislang aber noch nicht beobachtet werden.

Für die TsdAK<sub>208</sub>G-Variante des *A. vinosum* Proteins konnte keine Hysterese festgestellt werden (3.3.3). Die ermittelten Potentiale für das TsdAK<sub>208</sub>G-Protein betragen - 165 mV und - 250 mV (3.3.3). Auf Basis der ermittelten Daten konnten die gemessenen Potentiale nicht definiert den beiden Hämen zugeordnet werden. Wahrscheinlich ist jedoch ein niedrigeres Redoxpotential für das His/Cys-koordinierte Häm 1, was eine Art Wechselwirkung der Häme miteinander bedeuten würde, da das Redoxpotential von Häm 1 nun niedriger als im TsdA Wildtyp-Protein wäre. Ein Austausch der Aminosäure Lysin hat damit ein drastisches Absinken des Redoxpotentials von + 50 mV für das Häm 2 im TsdA Wildtyp-Protein zu - 165 mV für das Häm 2 in der TsdAK<sub>208</sub>G-Variante zur Folge. Ein Wechsel des „low-spin“ Status in den „high-spin“ Status eines Hämes geht immer mit einem Absinken des Redoxpotentials, durch das Eindringen von Wassermolekülen in die Häm-Exkavation, einher (Battistuzzi et al. 2002; Battistuzzi et al. 2006; Bellei et al. 2006). Ein noch gravierenderes Absinken des Redoxpotentials ist nur durch die Bindung von Cyanid an ein Häm im „low-spin“ Status möglich (Battistuzzi et al. 2010). Die Analyse der Struktur der AvTsdA-Variante lässt aber eher auf ein pentakoordiniertes Häm in diesem Protein schließen (s. o.). In der TsdA-Variante TsdAK<sub>208</sub>N kann eine Hysterese

vermutlich auch ausgeschlossen werden, da Häm 2 im oxidierten Zustand des Proteins His/Met-koordiniert ist und keine Änderung des Liganden beim Wechsel des Redoxstatus erfolgt (3.3.2). Dennoch kann dieser Wechsel des distalen Häm-Liganden im Vergleich zum TsdA Wildtyp-Protein die Veränderung grundlegender Charakteristika des Proteins bedeuten, da eine Methionin-Ligation im oxidierten Zustand ganz andere Eigenschaften aufweist. Eine His/Met-Koordination eines Hämes wirkt sich zum Beispiel auf das Redoxpotential des Proteins aus, da Methionin-koordinierte Häme in der Regel ein stark positives Redoxpotential aufweisen (Cheesman et al. 2001; Battistuzzi et al. 2002). Ein Beispiel dafür sind die His/Met-koordinierten Häme der SoxXA-Proteine in *Paracoccus pantotrophus* und *Rhodovulum sulfidophilum* mit Potentialen von + 189 mV und + 210 mV (Reijerse et al. 2007; Bradley et al. 2012). Ein Anstieg des Redoxpotentials an Häm 2 in der TsdAK<sub>208</sub>N-Variante im Vergleich zum TsdA Wildtyp-Protein, durch den Wechsel des distalen Häm-Liganden von Lysin zu Methionin, ist anzunehmen.

**Tabelle 18: Spektrale Charakteristika von TsdAwt , TsdAK<sub>208</sub>G, TsdAK<sub>208</sub>N und TsdAM<sub>209</sub>G**

Protein (pH)	Soret ox.	delta Peak	Soret red.	$\alpha$ -Peak	$\beta$ -Peak	$E_{\text{Soret}}/E_{280\text{nm}}$	$E_{\alpha}/E_{\beta}$	Absorptionsmaxima im langwelligen Bereich
TsdAwt (pH 6.5)	407,2	357,4	419,8	554,6	524,0	3,335	1,27	634 nm (ox)
TsdAK <sub>208</sub> N (pH 6.5)	413,4	357,6	420,4	554,6	524,0	2,734	1,27	620 nm; 695 nm (ox)
TsdAK <sub>208</sub> G (pH 6.5)	406,2	357,4	420,4	554,6	524,0	2,756	1,35	620.8 nm; 696.8 nm (ox)
TsdAM <sub>209</sub> G (pH 6,5)	404,8	351,0	417,2	552,6	523,2	3,118	1,64	630.2 nm (ox)

(ox) = Spektrum des oxidierten Proteins

Dazu passt, dass in der spektralen Analyse der TsdAK<sub>208</sub>N-Variante der Soret-Peak eine verminderte Intensität aufweist und in den langwelligeren Bereich verschoben ist (3.3.4 und Tabelle 18). Die Verschiebung des Soret-Peaks im Vergleich zum TsdA Wildtyp-Protein ist ein Hinweis darauf, dass ein Häm in TsdAK<sub>208</sub>N durch einen stärkeren Feldliganden koordiniert wird (Girvan et al. 2006) und kann auf den Austausch von Lysin durch Methionin als distaler Ligand zurückgeführt werden. Weiterhin konnte in Spektren beider TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten im oxidierten Status ein Peak bei 695 nm detektiert werden, welcher auf eine Methionin-Ligation eines der Häme hinweist (Miles et al. 1993). Für TsdAK<sub>208</sub>G wurde diese Ligation nicht festgestellt, allerdings schließt die noch nicht abgeschlossene Analyse diese auch nicht aus (3.3.2). Für diese Interpretation spricht, dass Spektren der TsdAM<sub>209</sub>G-Variante diesen Peak nicht mehr aufweisen (3.3.5). Für die TsdAM<sub>209</sub>G-Variante konnten starke Veränderungen der spektralen Charakteristika im

Vergleich zu dem TsdA Wildtyp-Protein beobachtet werden. Der Soret-Peak, der  $\delta$ -, der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Peak waren in den kurzwelligeren Bereich verschoben (Tabelle 18). Die Veränderung der Absorptionsmaxima in einen Bereich mit kürzerer Wellenlänge weist eindeutig auf den Austausch eines starken durch einen schwachen Feldliganden bei einem der Häme hin (Girvan et al. 2006). Methionin kann in dem reduzierten Zustand nicht mehr als Ligand fungieren und Glycin ist nicht in der Lage das Eisen des Hämes zu koordinieren. In dem reduzierten Zustand konnte ein Peak bei 630 nm detektiert werden, welcher als Indikator für „high-spin“ Häm gewertet werden kann (Miles et al. 1993) oder als Zeichen für ein Cystein(Thiolat) (Marvin et al. 2008). Allerdings beziehen sich beide Interpretationen auf Proteine im oxidierten Zustand, weshalb auch die Möglichkeit einer Interaktion mit Natriumdithionit in Betracht gezogen werden muss.

#### 4.6. Funktion von Häm 2

Im Gegensatz zu den TsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten waren die TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten sowie auch die TsdA Methionin<sub>209</sub>-Variante der TsdA aus *A. vinosum* stabil und konnten leicht produziert und aufgereinigt werden (3.3.1). Der Austausch der Aminosäuren Lysin und Methionin beeinträchtigt demnach nicht die Stabilität des Proteins.

Die TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten konnten durch die Zugabe von Thiosulfat teil-reduziert werden (Abbildung 35). Allerdings konnte die Reduktion mit Thiosulfat im Vergleich zu dem TsdA Wildtyp-Protein nur unvollständig erfolgen, was auf eine verminderte Aktivität mit dem Substrat Thiosulfat schließen lässt. Interessanterweise konnte keine Reduktion der TsdAM<sub>209</sub>G-Variante durch Thiosulfat erfolgen, obwohl in der kinetischen Analyse eine katalytische Aktivität feststellbar war. Vermutlich ist die Katalyse der TsdAM<sub>209</sub>G stark pH-abhängig und bei pH 6,5 kann keine Bindung des Substrates Thiosulfat erfolgen. In Messungen zur Oxidation von Thiosulfat konnte eine 10- bis 15-fache Verminderung der maximalen spezifischen Aktivität der TsdA Lysin<sub>208</sub>- und TsdA Methionin<sub>209</sub>-Varianten bei pH 4,0 festgestellt werden, sowie eine fünffach niedrigere Aktivität bei pH 5,0 (Tabelle S 1). Diese Ergebnisse zeigen, dass Häm 2 einen großen Einfluss auf die katalytische Aktivität der TsdA hat.

Die Substrataffinität veränderte sich bei pH 4,0 im Vergleich zu dem TsdA Wildtyp-Protein nicht. Bei einem pH-Wert von 5,0 war für die TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten die gleiche Steigerung der Substrataffinität zu beobachten wie schon für das TsdA Wildtyp-Protein. Dieser Effekt kann eventuell auf den unterschiedlichen Protonierungsgrad des

Cysteins bei verschiedenen pH-Werten zurück geführt werden (Zhong et al. 2014; 4.3). Zusätzlich fiel allerdings auf, dass die Substrataffinität zu Thiosulfat bei pH 5,0 zwischen den TsdA-Varianten sich unterschied. TsdA Wildtyp-Protein und die TsdAK<sub>208</sub>N-Variante wiesen einen niedrigen  $S_{[0.5]}$ -Wert von 0,18 mM beziehungsweise 0,17 mM auf, während für die Proteine TsdAK<sub>208</sub>G und TsdAM<sub>209</sub>G ein deutlich höherer Wert, ca. doppelt so hoch mit 0,46 mM und ca. zehnfach so hoch mit 1,08 mM gemessen werden konnte. Eine Korrelation der Substrataffinität mit der Stärke des Feldliganden an Häm 2 kann beobachtet werden. Das TsdA Wildtyp-Protein ist im oxidierten und reduzierten Zustand hexakoordiniert (3.1.1), und die TsdAK<sub>208</sub>N-Variante hat mit Methionin im oxidierten und reduzierten Zustand einen starken Liganden (3.3.2). TsdAK<sub>208</sub>G ist entweder pentakoordiniert oder zeichnet sich zumindest durch einen sehr schwachen Feldliganden aus (3.3.2) und in der TsdAM<sub>209</sub>G-Variante fehlt mit Methionin ein starker Feldligand an Häm 2. Es fällt auf, dass eine schwache Ligation an Häm 2 eine niedrige Substrataffinität zum Substrat Thiosulfat bei pH 5,0, bedeutet. Für die TsdA aus *W. succinogenes*, bei der als distaler Ligand an Häm 2 vermutlich ein Methionin fungiert, konnte eine sehr niedrige Substrataffinität zu Thiosulfat von 4,3 mM festgestellt werden (Herresthal 2014), was diese Theorie stützen würde. Allerdings hat das Fusionsprotein TsdA/TsdB aus *M. purpuratum* eine vergleichsweise hohe Affinität zu Thiosulfat mit einem  $S_{[0.5]}$ -Wert von 0,26 mM, obwohl in dieser TsdA vermutlich auch eine Methionin-Ligation an Häm 2, im oxidierten und reduzierten Zustand des Proteins, vorliegt. Die TsdA aus *M. purpuratum* wird aber immer zusammen mit dem endogenen Elektronenakzeptor TsdB exprimiert und sowohl für die AvTsdA als auch die CjTsdA konnte gezeigt werden, dass bei der Bestimmung der Thiosulfatdehydrogenase-Aktivität der Elektronenakzeptor scheinbar einen Einfluss auf die Affinität der TsdA zu Thiosulfat hat (3.4.2, 3.4.4 und 3.6.3).

Die kinetische Analyse der Tetrathionat-Reduktion zeigte ähnlich große Unterschiede zwischen dem TsdA Wildtyp-Protein und den TsdA Lysin<sub>208</sub>-Varianten auf. Nur der  $k_{cat}$ -Wert liegt bei allen drei untersuchten Proteinen in einem ähnlichen Bereich (Tabelle S 1). Das TsdAM<sub>209</sub>G-Protein hatte eine deutlich höhere, spezifische Aktivität und war insgesamt katalytisch effizienter bei der Reduktion von Tetrathionat (Tabelle S 1). Bei dem direkten Vergleich fällt auf, dass die Substrataffinität niedriger bei einem starken distalen Ligand von Häm 2 ist. Das Methionin-koordinierte Häm der TsdAK<sub>208</sub>N Variante hat einen hohen  $S_{[0.5]}$ -Wert für die Reduktion von Tetrathionat mit 1,95 mM und das im reduzierten Zustand Methionin-koordinierte TsdA Wildtyp-Protein einen  $S_{[0.5]}$ -Wert von 1,98 mM. Im Gegensatz dazu haben die AvTsdA-Varianten TsdAK<sub>208</sub>G und TsdAM<sub>209</sub>G,

welche sich beide durch einen schwachen distalen Liganden an Häm 2 auszeichnen, die deutlich niedrigeren  $S_{[0.5]}$ -Werte von 1,17 mM beziehungsweise 1,16 mM. Während der Bindung von Tetrathionat und Übertragung der Elektronen auf dieses, liegt TsdA im teil-reduzierten Zustand vor und vermutlich ligiert die Aminosäure Methionin<sub>209</sub> das Häm im TsdA Wildtyp-Protein. Methionin-ligierte Häme haben in der Regel ein sehr hohes Redoxpotential (Cheesman et al. 1997) und das Methionin<sub>209</sub> führt in AvTsdA zu einem positiven Redoxpotential von Häm 2 (3.1.2) Ein Wegfall des Methionins führt vermutlich zu einem Absinken des Redoxpotentials, da Häm 2 nun auch im reduzierten Zustand His/Lys-ligiert vorliegt und Methionin nicht mehr das reduzierte Eisen (FeII) stabilisiert (Pearson und Songstad 1967). An dem Beispiel von Pferdeherz Cytochrom *c* konnte ein Abfall von - 200 mV bei einem Wechsel des distalen Häm-Liganden von Methionin zu Lysin festgestellt werden (Mugnol et al. 2008). Elektronen können durch den Austausch des Methionins leichter abgegeben und auf Tetrathionat übertragen werden. Ein Austausch der Aminosäure Lysin könnte einen ähnlichen, etwas verminderten Effekt haben.

**Tabelle 19: Redoxpotential und distaler Ligand an Häm 2 der AvTsdA-Varianten im Bezug zur Substrataffinität zu Thiosulfat und Tetrathionat**

Protein	distaler Ligand		Redoxpotential Häm 2	$S_{[0.5]}$ -Wert	
	oxidiertes Zustand	reduzierter Zustand		$S_2O_3^{2-}$ -Oxidation	$S_4O_6^{2-}$ -Reduktion
TsdA	Lysin	Methionin	+ 50 mV	0,18	1,98
TsdAK <sub>208N</sub>	Methionin	Methionin	+*	0,17	1,95
TsdAK <sub>208G</sub>	"high-spin"/Methionin	Methionin	- 250 mV	0,46	1,17
TsdAM <sub>209G</sub>	Lysin	"high-spin"/Lysin	-*	1,08	1,16

\* = erwartete Tendenz auf Basis von Literaturwerten für vergleichbare Häm-Eisen-Koordinationen

In Tabelle 19 sind die verschiedenen TsdA-Varianten mit ihrem distalen Ligand für Häm 2 im oxidierten und reduzierten Zustand des Proteins aufgelistet und den Substrataffinitäten für Thiosulfat und Tetrathionat gegenüber gestellt. Eine wichtige Rolle spielt das Redoxpotential von Häm 2, welches sich direkt auf die Substrataffinität auswirkt. Ein positives Potential, welches sich aus einem starken Feldliganden ergibt, bewirkt eine hohe Affinität zu Thiosulfat, ein negatives Potential, hervorgerufen durch einen schwachen Feldligand von Häm 2, führt zu einer vergleichsweise hohen Affinität zu Tetrathionat. Um diesen Zusammenhang besser zu verstehen wäre eine Strukturanalyse der TsdAM<sub>209G</sub>-Variante im oxidierten und reduzierten Zustand sowie eine Bestimmung des Redoxpotentials aller AvTsdA Lysin<sub>208</sub>- und Methionin<sub>209</sub>-Varianten sinnvoll. In der TsdA aus *A. vinosum* hat das Häm 2 eindeutig eine katalytische Funktion und auch Ein-

fluss auf das „Fine Tuning“ der Thiosulfatdehydrogenase-Aktivität und Tetrathionatreduktase-Aktivität des Proteins in Form von  $V_{\max}$ - und  $S_{[0.5]}$ -Wert. Weitere Ergebnisse der Strukturanalyse von AvTsdA weisen darauf hin, dass der Substratkanal vermutlich in der Umgebung von Häm 2 vorzufinden ist (persönliche Mitteilung Dr. José Brito), was die Hypothese einer katalytischen Funktion von Häm 2 stützt.

Auf Basis der strukturellen Ähnlichkeiten der TsdA-Proteine ist anzunehmen, dass das Häm 2 auch in den TsdAs aus anderen Organismen diese Funktion einnimmt. Allerdings sind einige Unterschiede im „Fine Tuning“ dieser Aktivitäten zu erwarten, da zum Beispiel in der TsdA aus *W. succinogenes*, Häm 2 vermutlich von einem Methionin koordiniert wird und die TsdA dennoch eine sehr niedrige Affinität zu Thiosulfat hat. Ein starker Ligand an Häm 2 würde bei dieser TsdA nicht auf eine hohe Affinität zu Thiosulfat und eine niedrige Affinität zu Tetrathionat verweisen, wie dies für die TsdA aus *A. vinosum* gezeigt wurde. Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass bei der katalytischen Aktivität nicht nur das katalytisch aktive Häm eine Rolle spielt, sondern auch die Umgebung des Hämes sowie die Beschaffenheit des Substratkanals und Unterschiede in der Struktur der TsdA-Proteine könnten auch einen Einfluss auf diese Parameter haben. Insgesamt kann festgestellt werden, dass Häm 2 auf jeden Fall einen Einfluss auf die katalytische Aktivität, sowohl auf die maximale spezifische Aktivität als auch auf die Substrataffinität zu Thiosulfat und Tetrathionat, hat. Es könnte sich demnach bei Häm 2 um das katalytisch aktive Zentrum der TsdA handeln. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass Häm 2 das katalytische Zentrum nicht darstellt sondern dieses nur unmittelbar beeinflusst.

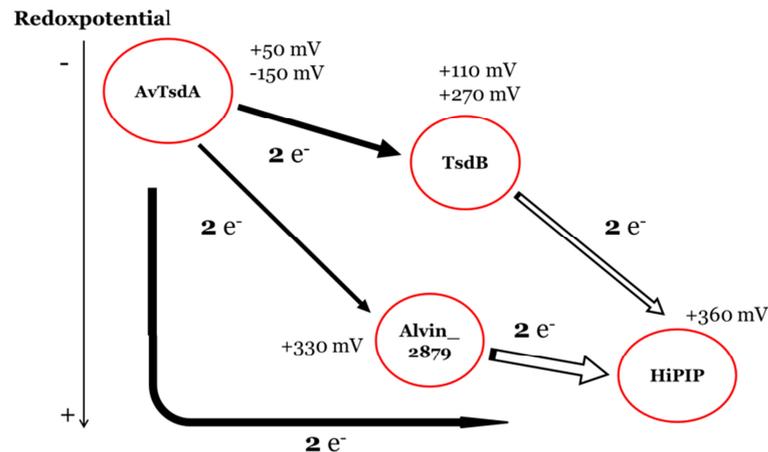
#### 4.7. Mögliche Elektronenakzeptoren der Thiosulfatdehydrogenasen

Die TsdA aus *C. jejuni* konnte das Monohäm Pferdeherz Cytochrom *c* als Elektronenakzeptor nutzen und dieses unter Zugabe von Thiosulfat vollständig reduzieren (Abbildung 50). CjTsdA hat mit Pferdeherz Cytochrom *c* eine hohe spezifische Thiosulfatdehydrogenase-Aktivität bei einem pH-Optimum von 5,0 (Abbildung 51 und Abbildung 52). Im Gegensatz dazu konnte Pferdeherz Cytochrom *c* nicht als Elektronenakzeptor für die TsdA aus *A. vinosum* dienen. Eine Reduktion des *c*-Typ Cytochroms durch TsdA war nicht möglich (Liu et al. 2013). Bereits 2001 wurde von Sperling beobachtet, dass ein Monohäm Cytochrom vermutlich keinen endogenen Elektronenakzeptor von TsdA darstellt (Sperling 2001). Aus diesem Grund wurde das Protein TsdB, welches der endogene Elektronenakzeptor des TsdA-Homologen Proteins aus *T. intermedia* und im Gegensatz

zu Pferdeherz Cytochrom *c* ein Dihäm Cytochrom ist, getestet. TsdA aus *A. vinosum* kann TsdB auch als Elektronenakzeptor nutzen und reduziert dieses unter Zugabe von Thiosulfat (3.4.2 (Denkmann et al. 2012; Liu et al. 2013)). Die Bestimmung des Redoxpotentials ergab die sehr positiven Potentiale von + 110 mV und + 270 mV für die beiden Häme des Dihäm Cytochroms, womit TsdB ein passender Elektronenakzeptor für TsdA ist. In der kinetischen Analyse konnte nur eine sehr niedrige spezifische Aktivität und eine katalytische Effizienz mit einem  $k_{cat}/S_{[0.5]}$ -Wert von  $2,7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  gemessen werden (3.4.2). Die Substrataffinität zu Thiosulfat ist ungefähr zehnfach erhöht im Vergleich zu Ferricyanid als artifiziellem Elektronenakzeptor (vergleiche 3.1.4 und 3.4.2). Vielleicht interagiert TsdA mit TsdB, wodurch eine bessere Bindung zu dem Substrat ermöglicht wird. Eine ähnliche Problematik wurde auch für die CjTsdA festgestellt, die eine über zehnfach höhere Substrataffinität zu Thiosulfat mit Pferdeherz Cytochrom *c* als Elektronenakzeptor im Vergleich zu Ferricyanid aufweist. Eine Veränderung der Substrataffinität in Abhängigkeit des Elektronenakzeptors konnte auch schon für die NADH-Ferredoxin Oxidoreduktase aus verschiedenen Mycobakterien-Stämmen festgestellt werden. Allerdings war die Affinität zu dem Substrat NADH mit dem artifiziellem Elektronenakzeptor Ferricyanid höher als mit Cytochrom *c* und die Affinität unterschied sich nur um den Faktor zwei (Sielaff und Andreesen 2005). Im Gegensatz zu AvTsdA war CjTsdA nicht in der Lage TsdB als Elektronenakzeptor zu nutzen. Die TsdA konnte TsdB in Gegenwart von Thiosulfat nur partiell reduzieren (Abbildung 49). Ein TsdB-Homologes Protein kommt auch in *P. stutzeri* vor, wo es als endogener Elektronenakzeptor der Pst-TsdA dienen könnte. Versuche mit der TsdB aus *T. intermedia* zeigten, dass PstTsdA prinzipiell Elektronen auf ein TsdB-Protein übertragen kann (van Helmont 2012). In *S. lithotrophicus* codiert das Gen slit1877 für ein TsdB-Protein, welches als endogener Elektronenakzeptor des TsdA-Homologen Proteins Slit1878 fungiert (Klein 2012). TsdB ist Teil des Fusionsproteins TsdA/TsdB in *M. purpuratum* und die Elektronen werden vermutlich über diese Proteindomäne auf ein Akzeptorprotein übertragen (Reuter 2013). In *A. vinosum* weist das *c*-Typ Cytochrom Alvin\_2879 in der Datenbankanalyse die größte Ähnlichkeit zu TsdB aus *T. intermedia* auf. In *A. vinosum* ist das Protein vermutlich über das hydrophobe Protein Alvin\_2880 an die Membran gebunden. Alvin\_2879 hat ein sehr hohes Redoxpotential von + 330 mV (Cusanovich und Bartsch 1969). Das positive Redoxpotential erlaubt Alvin\_2879 ein möglicher endogener Elektronenakzeptor der AvTsdA zu sein und vermutlich auch ein passender Elektronendonator für das photosynthetische Reaktionszentrum (van Beeumen 1991). In dem UV-Vis Spektrum konnte Al-

vin\_2879 nach der Zugabe von Thiosulfat durch TsdA reduziert und eine maximale katalytische Aktivität  $V_{\max}$  von 0,2 U/mg konnte gemessen werden (3.4.3). Die spezifische Aktivität ist damit nicht höher als wenn TsdB als Elektronenakzeptor der TsdA fungiert (3.4.2). Allerdings lag das Protein Alvin\_2879 nicht in einer einheitlichen Form vor, da auf dem SDS-Gel mehrere Banden zu erkennen waren und eine Gelfiltration ergab, dass Alvin\_2879 sowohl als Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer unter den gewählten Bedingungen auftritt (3.4.3). Das Protein Alvin\_2879 neigt zur Oligomerisierung und eine Auftrennung in die verschiedenen Oligomere erwies sich aufgrund überlappender Elutionsfraktionen als schwierig. Von einer weiteren Auftrennung/Aufreinigung wurde zunächst abgesehen, da die sehr niedrige spezifische Aktivität (ca. 25.000-fach niedriger als mit Ferricyanid bei pH 5,0) nicht auf eine Funktion als endogener Elektronenakzeptor der Thiosulfatdehydrogenase hinweist. In CjTsdA konnte kein TsdB-Homologes Protein identifiziert werden, aber ein zweites TsdA-Homolog, das Protein C8j\_0040. Eine Funktion als Elektronenakzeptor für CjTsdA kann aber ausgeschlossen werden, da CjTsdA nicht in der Lage ist C8j\_0040 unter Zugabe von Thiosulfat zu reduzieren (3.6.1). Nachdem bereits ein Monohäm und Dihäm Cytochrom als mögliche Elektronenakzeptoren getestet wurden, blieb noch die Enzymklasse der Eisen-Schwefel-Cluster Proteine. Bereits 1979 wurde eine TsdA-Aktivität mit HiPIP als Elektronenakzeptor gemessen und ein Wert von 0,5 U/mg errechnet (Fukumori und Yamanaka 1979). In dieser Arbeit wurden beide Proteine rekombinant in *E. coli* produziert und festgestellt, dass HiPIP unter Zugabe von Thiosulfat durch TsdA reduziert werden kann. Ein Redoxpotential von + 360 mV ermöglicht es HiPIP ein direktes Reduktionsmittel des photosynthetischen Reaktionszentrums in *A. vinosum* zu sein (Verméglio et al. 2002). Durch das hohe Redoxpotential könnte HiPIP auch als endogener Elektronenakzeptor der TsdA dienen (3.4.4). Eine kinetische Analyse bei der die Reduktion von HiPIP in Abhängigkeit von Thiosulfat untersucht wurde, ergab eine maximale spezifische Aktivität  $V_{\max}$  von 70,8 U/mg und einen  $S_{[0,5]}$ -Wert von 0,03 mM (3.4.4). Die spezifische Aktivität ist zwar ca. 70-fach geringer als mit Ferricyanid als Elektronenakzeptor bei pH 5,0, aber immerhin 350-fach höher im Vergleich zu den gemessenen Aktivitäten mit TsdB oder Alvin\_2879 als Elektronenakzeptor. Durch die hohe Substrataffinität zu Thiosulfat ist die katalytische Effizienz nur 14-fach niedriger als mit Ferricyanid. Auffällig ist, dass auch hier die Substrataffinität ungefähr zehnfach höher liegt als mit Ferricyanid als Elektronenakzeptor (3.1.4) und damit vergleichbar hoch, wenn TsdB als Elektronenakzeptor fungiert.

Insgesamt zeigen die kinetischen Parameter, dass HiPIP als ein Elektronenakzeptor der TsdA fungieren kann. In dem Organismus *Rubrivivax gelatinosus*, einem phototrophen Purpurbakterium, dient HiPIP auch als Elektronenakzeptor eines Dihäm *c*-Typ Cytochroms 4 und leitet die Elektronen an das photosynthetische Reaktionszentrum weiter (Ohmine et al. 2009). Für den phototrophen Organismus *Rhodospseudomonas palustris* sind zwei HiPIP-Proteine mit unterschiedlichen Funktionen nachgewiesen worden. Eines der Eisen-Schwefel-Cluster Proteine leitet Elektronen direkt zum Cytochrom *c*<sub>2</sub> im Reaktionszentrum weiter und das Zweite übernimmt eine sensorische Funktion im Periplasma (Bird et al. 2014). In *Ectothiorhodospira sp.* konnte gezeigt werden, dass ein „High-potential iron-sulfur-protein“ Elektronen von verschiedenen *c*-Typ Cytochromen an das Reaktionszentrum weiterleitet (Buche et al. 2000). Eine Reihe von unterschiedlichen Elektronendonoren für HiPIP konnte erfasst werden, in den meisten Fällen ist der finale Elektronenakzeptor der Eisen-Schwefel-Cluster Proteine das Cytochrom *c*<sub>2</sub> des Reaktionszentrums (Messerschmidt et al. 2006). Im Zusammenhang mit den durchgeführten Versuchen zu TsdA ist HiPIP ein wahrscheinlicher endogener Elektronenakzeptor der TsdA, welcher die Elektronen direkt ins photosynthetische Reaktionszentrum von *A. vinosum* leitet. Eisen-Schwefel-Cluster Proteine könnten auch als Elektronenakzeptoren in Organismen dienen, welche ein TsdA aber kein TsdB besitzen wie z.B. *P. arcticus*. In CjTsdA konnte kein vergleichbares Protein identifiziert werden. Allerdings kann das Fusionsprotein TsdA/TsdB aus *M. purpuratum* HiPIP (Alvin\_2274) als Elektronenakzeptor nutzen (Reuter 2013). Im DRAFT Genom von *M. purpuratum* ist ebenfalls ein „high-potential-iron-sulfur protein“ mit der Gennummer marpuDRAFT\_1783 kodiert. Eine Blast Analyse ergab eine hohe Übereinstimmung zu Alvin\_2274 von *A. vinosum* (Reuter 2013). Eisen-Schwefel-Cluster Proteine könnten eine größere Rolle als Elektronenakzeptoren von TsdAs spielen, als bislang angenommen. Die Beobachtung, dass das Fusionsprotein TsdA/TsdB, die Elektronen auf ein Eisen-Schwefel-Cluster Protein weiterleitet, lässt die Vermutung zu, dass TsdA die Elektronen zunächst auch auf ein Dihäm Cytochrom überträgt. In der Tat zeigen erste Ergebnisse, dass HiPIP und TsdB als kombinierte Elektronenakzeptoren für die AvTsdA fungieren können. Die AvTsdA weist in diesem Fall eine gestiegene Aktivität, im Vergleich zu Versuchen in denen nur HiPIP oder TsdB als Elektronenakzeptor eingesetzt wurde, auf (Franke 2013).



**Abbildung 56:** Schema der Elektronenübertragung von AvTsdA auf mögliche Elektronenakzeptoren. AvTsdA und mögliche Elektronenakzeptoren (rote Kreise) sind in Abhängigkeit ihres Redoxpotentials als Elektronenübertragungskette dargestellt. Schwarze Pfeile zeigen die nachgewiesene Übertragung von Elektronen, weiße Pfeile noch nicht bestätigten Transfer von Elektronen an.

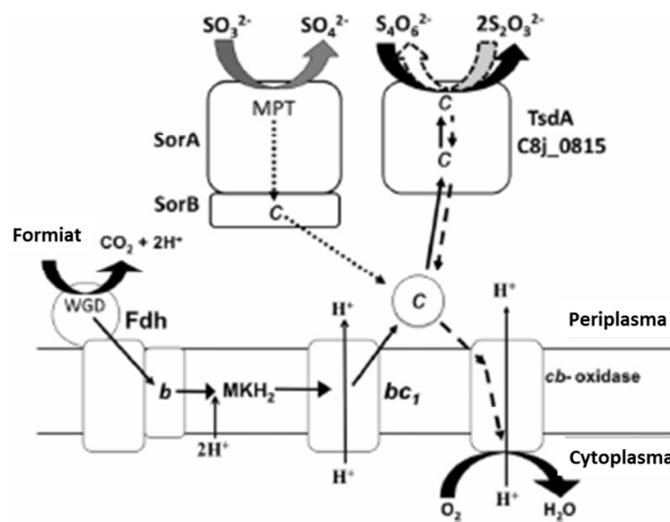
In Abbildung 56 sind mögliche Wege des Elektronentransfers von AvTsdA auf potentielle Elektronenakzeptoren dargestellt. Mit großer Wahrscheinlichkeit werden die Elektronen von AvTsdA auf ein Akzeptor-Cytochrom übertragen, welches entweder Alvin\_2879 oder ein anderes Dihäm Cytochrom ist (z. B. ein TsdB ähnliches Protein; Abbildung 56), und dann auf das Eisen-Schwefel-Cluster Protein HiPIP weitergeleitet, welches die Elektronen auf das photosynthetische Reaktionszentrum überträgt. Im Gegensatz zu *A. vinosum* betreibt *C. jejuni* keine Photosynthese und die Elektronen werden nicht über ein Eisen-Schwefel-Cluster Protein an das photosynthetische Reaktionszentrum, sondern vermutlich über ein Monohäm *c*-Typ Cytochrom an eine finale *cb*-Oxidase weitergeleitet (Abbildung 57). CjTsdA nimmt aufgrund der anderen metabolischen Gegebenheiten in *C. jejuni* eine vollständig andere Rolle ein als in *A. vinosum*, was sich auch in der Wahl des Elektronenakzeptors widerspiegelt. Insgesamt zeigt sich eine begrenzte Heterogenität unter den Elektronenakzeptoren von TsdA-Proteinen. Die TsdA-Proteine aus den Organismen *A. vinosum* und *M. purpuratum*, welche beide zu den *Chromatiaceae* gehören, übertragen die frei werdenden Elektronen vermutlich zunächst auf ein Dihäm Cytochrom und dann auf ein Eisen-Schwefel-Cluster Protein, das die Elektronen auf das photosynthetische Reaktionszentrum überträgt. Die Schwefeloxidierer *T. intermedia*, *T. acidophilus*, *T. sp. W5*, der Eisenoxidierer *S. lithotrophicus* und der Nitratreduzierer *P. stutzeri* enthalten in ihrem Genom Gene, die für TsdB-Homologe Proteine kodieren. Diese TsdB-Proteine werden teilweise unabhängig oder zusammen mit dem TsdA-Protein exprimiert und fungieren vermutlich in allen Fällen als Elektronenakzeptor der TsdA-Proteine (Siemen 2011; van Belmont 2012; Klein 2012; Denkmann et al. 2012). In dem pathogenen

Organismus *C. jejuni* fungiert weder ein TsdB noch ein Eisen-Schwefel-Cluster Protein als Elektronenakzeptor, sondern ein Monohäm Cytochrom *c*. Interessant ist in diesem Zusammenhang, ob in *W. succinogenes*, ebenfalls ein Vertreter der Helicobacteriaceae, ein Monohäm Cytochrom *c* den endogenen Elektronenakzeptor der TsdA darstellt. Anhand der bisher untersuchten TsdA-Proteine lässt sich kein Zusammenhang zwischen der katalytischen Funktionalität der TsdA als Thiosulfatdehydrogenase oder bifunktionales Enzym und des bevorzugten Elektronenakzeptor ableiten. Der endogene Elektronenakzeptor der TsdA ist abhängig vom Metabolismus des Organismus und hier muss besonderes unterschieden werden, zwischen phototrophen und chemotrophen Organismen. Am Beispiel von *A. vinosum* konnte gezeigt werden, dass Organismen, die kein TsdB-Protein enthalten und Photosynthese betreiben, die Elektronen zunächst auf ein Eisen-Schwefel Cluster Protein und dann auf das photosynthetische Reaktionszentrum übertragen könnten. Phototrophe Organismen, die ein TsdB-Protein enthalten, wie *M. purpuratum* könnten die Elektronen ebenfalls auf ein Eisen-Schwefel Cluster Protein übertragen und dann auf das photosynthetische Reaktionszentrum. *C. jejuni* ist ein Beispiel für chemotrophe Organismen, die kein TsdB-Protein enthalten. Interessant wäre in diesem Zusammenhang noch die weitere Analyse der TsdA aus *P. stutzeri*, ein chemotropher Organismus, der ein TsdB-Homologes Protein enthält. Vorstellbar wäre, dass die Elektronen in diesem Fall über das TsdB-Protein auf eine terminale Oxidase weitergeleitet werden.

#### 4.8. Physiologische Charakterisierung der Thiosulfatdehydrogenasen

Der TsdA aus *A. vinosum* konnte in Wachstumsexperimenten physiologisch eine Funktion als Thiosulfatdehydrogenase zugewiesen werden. Eine  $\Delta tsdA$ -Mutante konnte bei Wachstum auf Thiosulfat kein Tetrathionat mehr bilden und in einem  $\Delta tsdA/tsdA^+$ -Komplementationsstamm wurde eine zum *A. vinosum* Wildtypstamm ähnliche Umsetzung von Thiosulfat zu Tetrathionat beobachtet (Denkman et al. 2012). In *C. jejuni* konnte vor der Identifizierung des TsdA-Homologen Proteins CjTsdA schon ein Wachstum auf Tetrathionat unter mikroaeroben Bedingungen beobachtet werden (3.5.2). Über eine Datenbankanalyse konnte das Gen *c8j\_0815* als homologes Gen zu *tsdA* in *A. vinosum* identifiziert werden. Die Erstellung eines  $\Delta tsdA$ -Stammes, eines  $\Delta tsdA/tsdA^*$  Komplementationsstammes und der Vergleich mit dem *C. jejuni* 81116 Wildtyp Stamm, supplementiert mit Tetrathionat in anaeroben Zellsuspensionen und Formiat als Elektronendonator, lieferte schließlich die Erklärung für ein Wachstum von *C. jejuni* auf Tetrathionat (3.5.2). Die TsdA fungiert hier eindeutig als Tetrathionatreduktase. CjTsdA ist ein peri-

plasmatisches Protein und der Elektronentransport von dem Cytochrom *c* zu Tetrathionat wird vermutlich nicht elektrogen sein, aber die gesamte Atmungskette von Formiat zu Tetrathionat ist, durch die elektrogene Natur der Formiatdehydrogenase und des Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplexes, Energie-konservierend (Abbildung 57). Für ein limitiertes Wachstum ist diese Art der Energiegewinnung ausreichend, wie schon für andere Systeme mit, nicht elektrogenen, periplasmatischen Reduktasen, wie z. B. für Nitrat-, Nitrit-, TMAO- oder DMSO-Reduktasen, gezeigt wurde (Sellars et al. 2002; Nachamkin et al. 2008).



**Abbildung 57:** *In vivo* Model für den bidirektionalen Elektronentransport zwischen Tetrathionat und Thiosulfat katalysiert durch die *C. jejuni* TsdA. Durchgezogene Pfeile zeigen die Route des Elektronentransfers von Formiat über die Formiatdehydrogenase (Fdh) zu Tetrathionat über den Menachinonpool ( $\text{MKH}_2$ ) zum Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplex und periplasmatischem Cytochrom *c*. Gestrichelte Pfeile weisen auf den Elektronentransport von Thiosulfat zu Sauerstoff über die TsdA, periplasmatisches Cytochrom *c* und die *cb*-Typ Oxidase hin. Zum Vergleich zur Thiosulfat-Oxidation wurde die Sulfid: Cytochrom *c* Dehydrogenase (Myers 2005) mit Molybderin (MPT) als Cofaktor auch dargestellt. Der Elektronentransport von diesem Cytochrom zum Cytochrom *c* ist mit einem gepunkteten Pfeil dargestellt. Die Fdh, *bc<sub>1</sub>* und *cb*-Oxidase konservieren Energie über Protonen, TsdA und SorAB nicht. Modifiziert nach Abbildung 6 aus Liu et al. 2013.

Ein Vergleich der Sauerstoffverbrauchsdaten in dem mit Thiosulfat und Sauerstoff inkubierten Wildtyp, der *ΔtsdA*-Mutante oder dem komplementierten Stamm bewies, dass CjTsdA physiologisch auch als Thiosulfatdehydrogenase fungieren kann (3.5.4). Eine detaillierte Analyse der Funktionalität der CjTsdA zwischen Dehydrogenase- und Reduktasefunktion zu wechseln, wurde in *in vivo*-Experimenten bei denen Thiosulfat und Tetrathionat quantifiziert wurden mit Thiosulfat als Elektronendonator bei mikroaerobem Wachstum untersucht (3.5.4).

Im Gegensatz zu CjTsdA ist die physiologische Funktion von C8j\_0040 bis jetzt nicht bekannt, da die niedrige katalytische Aktivität vermutlich nicht zur physiologischen Thi-

osulfat-Oxidation oder zur Restaktivität in der *ΔtsdA*-Mutante beiträgt. Vollständig ausgeschlossen werden kann dies aber bisher nicht, und weitere Experimente zu C8j\_0040 sind aus diesem Grund notwendig.

Die TsdA kann physiologisch entweder als Thiosulfatdehydrogenase, wie am Beispiel von *A. vinosum* gezeigt werden konnte, oder als Tetrathionatreduktase, wie am Beispiel von *C. jejuni* gezeigt werden konnte, fungieren. Die Thiosulfatdehydrogenase ermöglicht Organismen neben der vollständigen Oxidation zu Sulfat, Thiosulfat unvollständig zu Tetrathionat zu oxidieren (Hensen et al. 2006). Organismen wie *C. jejuni*, die keine Molybdän-enthaltene Tetrathionatreduktase (Ttr), wie sie in *Salmonella typhimurum* gefunden wird (Hinojosa-Leon et al. 1986; Hensel et al. 1999) und keine Octahäm-Tetrathionatreduktase (Otr) enthalten, wie sie in *Shewanella oneidensis* gefunden wird (Atkinson et al. 2007), können mit Hilfe der TsdA auf Tetrathionat wachsen. Die TsdA verschafft damit dem Organismus vermutlich einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Organismen der Darmflora, ähnlich wie dies schon für die Ttr gezeigt werden konnte (Thiennimitr et al. 2011). Die Thiosulfatdehydrogenase ist damit neben den biochemischen, kinetischen und strukturellen Besonderheiten, auch physiologisch ein Protein von gewichtiger Bedeutung.

## 5. Zusammenfassung

Thiosulfatdehydrogenasen sind Dihäm *c*-Typ Cytochrome mit einer ungewöhnlichen His/Cys-Koordination eines Hämes und weit verbreitet unter Bakterien. TsdA-Proteine kommen in allen Gruppen der Proteobakterien und auch in grampositiven Organismen vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die TsdA-Proteine aus *A. vinosum* und *C. jejuni* als typische Vertreter dieser Enzymklasse charakterisiert. Die Enzyme aus diesen beiden Organismen dienen als Beispiel für die zwei Funktionsweisen der TsdA-Proteine, die Oxidation von Thiosulfat und die Reduktion von Tetrathionat. Die TsdA aus *A. vinosum* fungiert als Thiosulfatdehydrogenase, ähnlich wie homologe Proteine aus *T. intermedia* oder *P. stutzeri*. Im Gegensatz dazu ist die TsdA aus *C. jejuni* ein bifunktionales Enzym mit einer primären Funktion als Tetrathionatreduktase, ähnlich wie homologe Proteine aus *M. purpuratum* und vermutlich auch *W. succinogenes*. Diese Funktion verleiht dem Enzym zusätzliche, physiologische Relevanz, da die TsdA humanpathogener Bakterien wie *C. jejuni* einen Wachstumsvorteil in der Darmflora verschaffen könnte.

Am Beispiel der TsdA aus *A. vinosum* konnte über UV-Vis Spektren gezeigt werden, dass das konservierte Cystein, das als distaler Ligand eines Hämes fungiert, pH-abhängigen und Redox-abhängigen Veränderungen unterliegt. Bei einer Teilreduktion des Proteins kommt es zur Bildung eines Cystein(Thiolats). Anhand von AvTsdA Cystein<sub>96</sub>-Varianten wurde bewiesen, dass das Cysteins essentiell für die katalytische Aktivität ist und eine stabilisierende Funktion innerhalb der TsdA hat. Unklar ist noch, ob es sich bei dem His/Cys-koordinierten Häm um das katalytisch aktive Zentrum der TsdA handelt. Das zweite Häm wird in der oxidierten AvTsdA His/Lys-ligiert und vollführt einen Redox-abhängigen Ligandenwechsel zu einer His/Met-Koordination im reduzierten Zustand des Proteins. Anhand von TsdA Lysin- und Methionin-Varianten konnte gezeigt werden, dass die Häm-Eisen Koordination dieses Hämes einen starken Einfluss auf, sowohl die maximale spezifische Aktivität als auch die Substrataffinität zu Thiosulfat und Tetrathionat, hat. Diese Beobachtungen lassen eine katalytische Funktion des Hämes vermuten. An TsdA-Proteinen aus *C. jejuni*, *M. purpuratum* und *W. succinogenes* wurde nachgewiesen, dass es sich bei der His/Lys-Ligation der oxidierten AvTsdA um kein Charakteristikum der Thiosulfatdehydrogenasen handelt, während eine Methionin-Ligation vermutlich im reduzierten Zustand aller TsdA-Proteine vorzufinden ist.

Strukturell lassen sich Thiosulfatdehydrogenasen in zwei Gruppierungen einteilen. TsdA-Proteine, die mit ihrem endogenen Elektronenakzeptor TsdB zusammen exprimiert werden

und als Tetramer in Form von  $\alpha_2\beta_2$  vorkommen und TsdA-Proteine, die ohne ihren endogenen Elektronenakzeptor exprimiert werden und in Form von Monomeren oder Dimeren vorkommen. Sowohl die TsdA aus *A. vinosum* als auch die TsdA aus *C. jejuni* gehören zur zweiten Gruppierung, während das TsdA/TsdB-Protein aus *M. purpuratum* der ersten Gruppierung zugeordnet werden kann.

Die AvTsdA überträgt Elektronen vermutlich zunächst auf ein Dihäm *c*-Typ Cytochrom, von dem die Elektronen auf HiPIP (Alvin\_2274) und schließlich auf das photosynthetische Reaktionszentrum weitergeleitet werden. Diese Elektronentransportkette könnte beispielhaft für Organismen, die Photosynthese betreiben und kein TsdB-Homologes Protein enthalten, sein. *C. jejuni* dagegen betreibt keine Photosynthese und die Elektronen werden von der CjTsdA auf ein Monohäm *c*-Typ Cytochrom und dann vermutlich auf die terminale *cb*-Oxidase übertragen. Diese Elektronentransportkette könnte beispielhaft für Organismen sein, die keine Photosynthese betreiben und kein TsdB-Homologes Protein enthalten. In Organismen, die ein TsdB-Protein enthalten oder ein TsdA/TsdB-Fusionsprotein exprimieren, werden die Elektronen zunächst auf TsdB und dann entweder auf ein Eisen-Schwefel Cluster Protein übertragen, wie am Beispiel von *M. purpuratum* gezeigt werden konnte oder auf ein noch unbekanntes Akzeptorcytochrom weitergeleitet.

## 6. Literaturverzeichnis

Alderton, W. K.; Cooper, C. E.; Knowles, R. G. (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. In: *Biochem. J.* 357 (Pt 3), S. 593–615.

Alric, J.; Tsukatani, Y.; Yoshida, M.; Matsuura, K.; Shimada, K.; Hienerwadel, R. et al. (2004): Structural and functional characterization of the unusual triheme cytochrome bound to the reaction center of *Rhodovulum sulfidophilum*. In: *J. Biol. Chem.* 279 (25), S. 26090–26097. DOI: 10.1074/jbc.M400361200.

Arslan, E.; Schulz, H.; Zufferey, R.; Künzler, P.; Thöny-Meyer, L. (1998): Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* *c*-type cytochrome subunits of the *cbb3* oxidase in *Escherichia coli*. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251 (3), S. 744–747. DOI: 10.1006/bbrc.1998.9549.

Atkinson, S. J.; Mowat, C. G.; Reid, G. A.; Chapman, S. K. (2007): An octaheme *c*-type cytochrome from *Shewanella oneidensis* can reduce nitrite and hydroxylamine. In: *FEBS Letters* 581 (20), S. 3805–3808. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.07.005.

Bamford, V. A.; Bruno, S.; Rasmussen, T.; Appia-Ayme, C.; Cheesman, M. R.; Berks, Ben C.; Hemmings, A. M. (2002): Structural basis for the oxidation of thiosulfate by a sulfur cycle enzyme. In: *EMBO J.* 21 (21), S. 5599–5610.

Bandeiras, T. M.; Pereira, M. M.; Teixeira, M.; Moenne-Loccoz, P.; Blackburn, N. J. (2005): Structure and coordination of CuB in the *Acidianus ambivalens* aa3 quinol oxidase heme-copper center. In: *J. Biol. Inorg. Chem.* 10 (6), S. 625–635. DOI: 10.1007/s00775-005-0012-6.

Battistuzzi, G.; Bellei, M.; Bortolotti, C. A.; Sola, M. (2010): Redox properties of heme peroxidases. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 500 (1), S. 21–36. DOI: 10.1016/j.abb.2010.03.002.

Battistuzzi, G.; Bellei, M.; Zederbauer, M.; Furtmüller, P. G.; Sola, M.; Obinger, C. (2006): Redox thermodynamics of the Fe(III)/Fe(II) couple of human myeloperoxidase in its high-spin and low-spin forms. In: *Biochemistry* 45 (42), S. 12750–12755. DOI: 10.1021/bi061647k.

Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Cowan, J. A.; Ranieri, A.; Sola, M. (2002): Control of cytochrome *c* redox potential: axial ligation and protein environment effects. In: *J. Am. Chem. Soc.* 124 (19), S. 5315–5324.

- Bellei, M.; Jakopitsch, C.; Battistuzzi, G.; Sola, M.; Obinger, C. (2006): Redox thermodynamics of the ferric-ferrous couple of wild-type synechocystis KatG and KatG(Y249F). In: *Biochemistry* 45 (15), S. 4768–4774. DOI: 10.1021/bi0517943.
- Bird, L. J.; Saraiva, I. H.; Park, S.; Calçada, E. O.; Salgueiro, C. A.; Nitschke, W. et al. (2014): Nonredundant roles for cytochrome *c2* and two high-potential iron-sulfur proteins in the photoferrotroph *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1. In: *J. Bacteriol.* 196 (4), S. 850–858. DOI: 10.1128/JB.00843-13.
- Blattner, F. R.; Williams, B. G.; Blechl, A. E.; Denniston-Thompson, K.; Faber, H. E.; Furlong, L. et al. (1977): Charon phages: safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning. In: *Science* 196 (4286), S. 161–169.
- Boden, R.; Kelly, D. P.; Murrell, J. C.; Schäfer, H. (2010): Oxidation of dimethylsulfide to tetrathionate by *Methylophaga thiooxidans* sp. nov.: a new link in the sulfur cycle. In: *Environ. Microbiol.*, S. no. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02238.x.
- Bradley, J. M.; Marritt, S. J.; Kihlken, M. A.; Haynes, K.; Hemmings, A. M.; Berks, B. C. et al. (2012): Redox and Chemical Activities of the Hemes in the Sulfur Oxidation Pathway Enzyme SoxAX. In: *J. Biol. Chem.* 287 (48), S. 40350–40359. DOI: 10.1074/jbc.M112.396192.
- Brito, J. A.; Gutierrez, A.; Denkmann, K.; Dahl, C.; Archer, M. (2014): Production, crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Allochromatium vinosum* thiosulfate dehydrogenase TsdA, an unusual acidophilic *c*-type cytochrome. In: *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* 70 (10), S. 1424–1427.
- Brune, D. C. (1989): Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. In: *Biochim. Biophys. Acta* 975 (2), S. 189–221.
- Brüser, T.; Trüper, H. G.; Dahl, C. (1997): Cloning and sequencing of the gene encoding the high potential iron-sulfur protein (HiPIP) from the purple sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1352 (1), S. 18–22.
- Buche, A.; Picorel, R.; Moulis, J. M.; Verméglio, A. (2000): Periplasmic electron carriers and photo-induced electron transfer in the photosynthetic bacterium *Ectothiorhodospira* sp. In: *Photosyn. Res.* 65 (1), S. 53–62. DOI: 10.1023/A:1006486307473.

- Cheesman, M. R.; Ferguson, S. J.; Moir, J. W.; Richardson, D. J.; Zumft, W. G.; Thomson, A. J. (1997): Two enzymes with a common function but different heme ligands in the forms as isolated. Optical and magnetic properties of the heme groups in the oxidized forms of nitrite reductase, cytochrome *cd1*, from *Pseudomonas stutzeri* and *Thiosphaera pantotropha*. In: *Biochemistry* 36 (51), S. 16267–16276. DOI: 10.1021/bi971677a.
- Cheesman, M. R.; Little, P. J.; Berks, B. C. (2001): Novel heme ligation in a *c*-type cytochrome involved in thiosulfate oxidation: EPR and MCD of SoxAX from *Rhodovulum sulfidophilum*. In: *Biochemistry* 40 (35), S. 10562–10569.
- Cherney, M. M.; Bowler, B. E. (2011): Protein dynamics and function: Making new strides with an old warhorse, the alkaline conformational transition of cytochrome *c*. In: *Coord. Chem. Rev.* 255 (7-8), S. 664–677. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.09.014.
- Christenson, A.; Gustavsson, T.; Lo, G.; Hägerhäll, C. (2008): Direct and mediated electron transfer between intact succinate:quinone oxidoreductase from *Bacillus subtilis* and a surface modified gold electrode reveals redox state-dependent conformational changes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1777 (9), S. 1203–1210. DOI: 10.1016/j.bbabi.2008.05.450.
- Cohn, F. (1875): "Untersuchungen über Bakterien.". In: *Beitrag Biologie Pflanzen* (1), S. 141–207.
- Cramer, C. (1870): Chemisch-Physikalische Beschreibung der Thermen von Baden in der Schweiz. Unter Mitarbeit von C. Müller. Baden.
- Cusanovich, M. A.; Bartsch, R. G. (1969a): A high potential cytochrome *c* from *Chromatium chromatophores*. In: *Biochim. Biophys. Acta* 189 (2), S. 245–255. DOI: 10.1016/0005-2728(69)90051-6.
- Cusanovich, M. A.; Bartsch, R. G. (1969b): A high potential cytochrome *c* from *Chromatium chromatophores*. In: *Biochim. Biophys. Acta* (189), S. 245–255.
- Dagert, M.; Ehrlich, S. D. (1979): Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. In: *Gene* 6 (1), S. 23–28.
- Dahl, C.; Friedrich, C. C.; Kletzin, A. (2008): Sulfur oxidation in prokaryotes. Chichester: Wiley, J.
- Denkman, K. (2011): Biochemische und enzymkinetische Analyse des ungewöhnlichen *c*-Typ Cytochroms Thiosulfatdehydrogenase aus *Allochromatium vinosum*. Bonn. Diplomarbeit.

- Denkmann, K.; Grein, F.; Zigann, R.; Siemen, A.; Bergmann, J.; van Helmont, S. et al. (2012): Thiosulfate dehydrogenase: a widespread unusual acidophilic *c*-type cytochrome. In: *Environ. Microbiol.* 14 (10), S. 2673–2688. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02820.x.
- Einsle, O. (2000): Cytochrome *c* Nitrite Reductase from *Wolinella succinogenes*. Structure at 1.6 Å resolution, inhibitor binding, and heme-packing motifs. In: *J. Biol. Chem.* 275 (50), S. 39608–39616. DOI: 10.1074/jbc.M006188200.
- Franke, T. (2013): Optimierung der heterologen Expression und biochemische Analyse des 'high potential iron sulfur protein' (HiPIP) aus *Allochromatium vinosum*. Bonn. Bachelorarbeit.
- Friedrich, T.; Hofhaus, G.; Ise, W.; Nehls, U.; Schmitz, B.; Weiss, H. (1989): A small isoform of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated *Neurospora crassa*. In: *Eur. J. Biochem.* 180 (1), S. 173–180.
- Fukumori, Y.; Yamanaka, T. (1979): A high-potential nonheme iron protein (HiPIP)-linked, thiosulfate-oxidizing enzyme derived from *Chromatium vinosum*. In: *Curr. Microbiol.* 3 (2), S. 117–120. DOI: 10.1007/BF02602443.
- Gaskin, D.; van Vliet, A. H. M.; Pearson B. (2007): The *Campylobacter* genetic toolbox: development of tractable and generally applicable genetic techniques for *Campylobacter jejuni*. In: *Zoonoses Public Health* (54), S. 101.
- Gaudin, C. F. M.; Grigg, J. C.; Arrieta, A. L.; Murphy, M. E. P. (2011): Unique Heme-Iron Coordination by the Hemoglobin Receptor IsdB of *Staphylococcus aureus*. In: *Biochemistry* 50 (24), S. 5443–5452. DOI: 10.1021/bi200369p.
- Girvan, H. M.; Seward, H. E.; Toogood, H. S.; Cheesman, M. R.; Leys, D.; Munro, A. W. (2006): Structural and Spectroscopic Characterization of P450 BM3 Mutants with Unprecedented P450 Heme Iron Ligand Sets: New heme ligation states influence conformational equilibria in P450 BM3. In: *J. Biol. Chem.* 282 (1), S. 564–572. DOI: 10.1074/jbc.M607949200.

Grein, F.; Venceslau, S. S.; Schneider, L.; Hildebrandt, P.; Todorovic, S.; Pereira, I. A. C.; Dahl, C. (2010): DsrJ, an Essential Part of the DsrMKJOP Transmembrane Complex in the Purple Sulfur Bacterium *Allochromatium vinosum*, Is an Unusual Triheme Cytochrome *c*. In: *Biochemistry* 49 (38), S. 8290–8299. DOI: 10.1021/bi1007673.

Guccione, E.; Hitchcock, A.; Hall, S. J.; Mulholland, F.; Shearer, N.; van Vliet, A. H. M.; Kelly, D. J. (2010): Reduction of fumarate, mesaconate and crotonate by Mfr, a novel oxygen-regulated periplasmic reductase in *Campylobacter jejuni*. In: *Environ. Microbiol.* 12 (3), S. 576–591. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02096.x.

Halcrow, Malcolm A. (2008): Trapping and manipulating excited spin states of transition metal compounds. In: *Chem. Soc. Rev.* 37 (2), S. 278–289. DOI: 10.1039/b701085k.

Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *J. Mol. Biol.* 166 (4), S. 557–580.

Hartshorne, R. S.; Kern, M.; Meyer, B.; Clarke, T. A.; Karas, M.; Richardson, D. J.; Simon, J. (2007): A dedicated haem lyase is required for the maturation of a novel bacterial cytochrome *c* with unconventional covalent haem binding. In: *Mol. Microbiol.* 64 (4), S. 1049–1060. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05712.x.

Hasler, J. A. (1999): Pharmacogenetics of cytochromes P450. In: *Mol. Aspects Med.* 20 (1-2), S. 12-24, 25-137.

Hensel, M.; Hinsley, A. P.; Nikolaus, T.; Sawers, G.; Berks, B. C. (1999): The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. In: *Mol. Microbiol.* 32 (2), S. 275–287.

Hensen, D.; Sperling, D.; Trüper, H. G.; Brune, D. C.; Dahl, C. (2006): Thiosulphate oxidation in the phototrophic sulphur bacterium *Allochromatium vinosum*. In: *Mol. Microbiol.* 62 (3), S. 794–810. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05408.x.

Herresthal, S. (2014): Heterologe Expression und Charakterisierung eines ungewöhnlichen *c*-Typ Cytochroms aus *Wolinella succinogenes*. Bonn. Bachelorarbeit.

Hinojosa-Leon, M.; Dubourdieu, M.; Sanchez-Crispin, J. A.; Chippaux, M. (1986): Tetrathionate reductase of *Salmonella typhimurium*: a molybdenum containing enzyme. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136 (2), S. 577–581.

Holleman; Wiberg, E. (1998): Lehrbuch der anorganischen Chemie. Berlin: Gruyter & Co.

- Horton, R. M. (1995): PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes. In: *Mol. Biotechnol.* 3 (2), S. 93–99. DOI: 10.1007/BF02789105.
- Imhoff, J. F.; Suling, J.; Petri, R. (1998): Phylogenetic relationships among the Chromatiaceae, their taxonomic reclassification and description of the new genera *Allochromatium*, *Halochromatium*, *Isochromatium*, *Marichromatium*, *Thiococcus*, *Thiohalocapsa* and *Thermochromatium*. In: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 Pt 4, S. 1129–1143.
- Ishikawa, H.; Nakagaki, M.; Bamba, A.; Uchida, T.; Hori, H.; O'Brian, M. R. et al. (2011): Unusual Heme Binding in the Bacterial Iron Response Regulator Protein: Spectral Characterization of Heme Binding to the Heme Regulatory Motif. In: *Biochemistry* 50 (6), S. 1016–1022. DOI: 10.1021/bi101895r.
- Jackson, R. J.; Elvers, K. T.; Lee, L. J.; Gidley, M. D.; Wainwright, L. M.; Lightfoot, J. et al. (2007): Oxygen reactivity of both respiratory oxidases in *Campylobacter jejuni*: the *cydAB* genes encode a cyanide-resistant, low-affinity oxidase that is not of the cytochrome *bd*-type. In: *J. Bacteriol.* 189 (5), S. 1604–1615. DOI: 10.1128/JB.00897-06.
- Janssen, P. J.; van Houdt, R.; Moors, H.; Monsieurs, P.; Morin, N.; Michaux, A. et al. (2010): The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. In: *PLoS ONE* 5 (5), S. e10433. DOI: 10.1371/journal.pone.0010433.
- Jørgensen, B. B. (1990): A thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. In: *Science* 249 (4965), S. 152–154. DOI: 10.1126/science.249.4965.152.
- Juhnke, H. D.; Hiltcher, H.; Nasiri, H. R.; Schwalbe, H.; Lancaster, C. R. D. (2009): Production, characterization and determination of the real catalytic properties of the putative 'succinate dehydrogenase' from *Wolinella succinogenes*. In: *Mol. Microbiol.* 71 (5), S. 1088–1101. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06581.x.
- Kmpf, C.; Pfennig, N. (1980): Capacity of Chromatiaceae for chemotrophic growth. Specific respiration rates of *Thiocystis violacea* and *Chromatium vinosum*. In: *Arch. Microbiol.* (127), S. 125–135.

- Kanao, T.; Kosaka, M.; Yoshida, K.; Nakayama, H.; Tamada, T.; Kuroki, R. et al. (2013): Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. In: *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 69 (Pt 6), S. 692–694. DOI: 10.1107/S1744309113013419.
- Kappler, U.; Aguey-Zinsou, KF.; Hanson, G. R.; Bernhardt, P. V.; McEwan, A. G. (2004): Cytochrome *c551* from *Starkeya novella*: characterization, spectroscopic properties, and phylogeny of a diheme protein of the SoxAX family. In: *J. Biol. Chem.* 279 (8), S. 6252–6260. DOI: 10.1074/jbc.M310644200.
- Kappler, U.; Bernhardt, P. V.; Kilmartin, J.; Riley, M. J.; Teschner, J.; McKenzie, K. J.; Hanson, G. R. (2008): SoxAX cytochromes, a new type of heme copper protein involved in bacterial energy generation from sulfur compounds. In: *J. Biol. Chem.* 283 (32), S. 22206–22214. DOI: 10.1074/jbc.M800315200.
- Kaprálék, F. (1972): The physiological role of tetrathionate respiration in growing *citrobacter*. In: *J. Gen. Microbiol.* 71 (1), S. 133–139.
- Kelly, D. P.; Chambers, L. A.; Trudinger, P. A. (1969): Cyanolysis and Spectrophometric Estimation of Trithionate in Mixture with Thiosulfate and Tetrathionate. In: *Anal. Biochem.*
- Kelly, D. P.; Wood, A. P. (2000): Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus gen. nov.*, *Halothiobacillus gen. nov.* and *Thermitiobacillus gen. nov.* In: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 Pt 2, S. 511–516.
- Kikumoto, M.; Nogami, S.; Kanao, T.; Takada, J.; Kamimura, K. (2013): Tetrathionate-forming thiosulfate dehydrogenase from the acidophilic, chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (1), S. 113–120. DOI: 10.1128/AEM.02251-12.
- Klein, E.-M. (2012): Biochemische Untersuchung der potentiellen Thiosulfatdehydrogenase Slit1878 & deren potentiellen Elektronenakzeptor Slit1877 aus *Sideroxydans lithotrophicus*. Bonn. Bachelorarbeit.
- Koch, T. (2012): Bioinformatische und biochemische Analyse von Di-Häm Cytochromen des *c*-Typs aus *Allochromatium vinosum* und Umweltchlamydien. Bonn. Bachelorarbeit.

- Koppenhöfer, A.; Turner, K. L.; Allen, J. W.; Chapman, S. K.; Ferguson, S. J. (2000): Cytochrome *cd(1)* from *Paracoccus pantotrophus* exhibits kinetically gated, conformationally dependent, highly cooperative two-electron redox behavior. In: *Biochemistry* 39 (15), S. 4243–4249.
- Kosciow, K. (2011): Charakterisierung rekombinanter Thiosulfatdehydrogenasen aus dem humanpathogenen  $\epsilon$ -Proteobakterium *Campylobacter jejuni*. Bonn. Bachelorarbeit.
- Krupovic, M.; Peixeiro, N.; Bettstetter, M.; Rachel, R.; Prangishvili, D. (2012): Archaeal Tetrathionate Hydrolase Goes Viral: Secretion of a Sulfur Metabolism Enzyme in the Form of Virus-Like Particles. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (15), S. 5463–5465. DOI: 10.1128/AEM.01186-12.
- Kuenen, J. G.; Robertson, L. A.; Touvinen, O. (1992): The genera *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, and *Thiosphaera*. Berlin: Springer.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Latimer, W. M. (1952): The oxidation states of the elements and their potentials in aqueous solutions. 2. Aufl. New York: Prentice Hall.
- Lemberg, R.; Barrett, J. (1973): Cytochromes. London: Academic Press.
- Leys, D. (2000): Crystal Structures of an Oxygen-binding Cytochrome *c* from *Rhodobacter sphaeroides*. In: *J. Biol. Chem.* 275 (21), S. 16050–16056. DOI: 10.1074/jbc.275.21.16050.
- Liu, Y.-W.; Denkmann, K.; Kosciow, K.; Dahl, C.; Kelly, D. J. (2013): Tetrathionate stimulated growth of *Campylobacter jejuni* identifies a new type of bi-functional tetrathionate reductase (TsdA) that is widely distributed in bacteria. In: *Mol. Microbiol.* 88 (1), S. 173–188. DOI: 10.1111/mmi.12176.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *J. Biol. Chem.* 193 (1), S. 265–275.
- Maalcke, W. J.; Dietl, A.; Marritt, S. J.; Butt, J. N.; Jetten, M. S. M.; Keltjens, J. T. et al. (2014): Structural basis of biological NO generation by octaheme oxidoreductases. In: *J. Biol. Chem.* 289 (3), S. 1228–1242. DOI: 10.1074/jbc.M113.525147.

- Mandel, M.; Higa, A. (1970): Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. In: *J. Mol. Biol.* 53 (1), S. 159–162.
- Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook, J. (1982): Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marvin, K. A.; Kerby, R. L.; Youn, H.; Roberts, G. P.; Burstyn, J. N. (2008a): The Transcription Regulator RcoM-2 from *Burkholderia xenovorans* Is a Cysteine-Ligated Hemoprotein That Undergoes a Redox-Mediated Ligand Switch †. In: *Biochemistry* 47 (34), S. 9016–9028. DOI: 10.1021/bi800486x.
- Marvin, Katherine A.; Kerby, Robert L.; Youn, Hwan; Roberts, Gary P.; Burstyn, Judith N. (2008b): The Transcription Regulator RcoM-2 from *Burkholderia xenovorans* Is a Cysteine-Ligated Hemoprotein That Undergoes a Redox-Mediated Ligand Switch †. In: *Biochemistry* 47 (34), S. 9016–9028. DOI: 10.1021/bi800486x.
- Messerschmidt, A.; Huber, R.; Poulas, T.; Wiegardt, K.; Cygler, M.; Bode, W. (2006): Handbook of Metalloproteins. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Meulenberg, R.; Pronk, J. T.; Frank, J.; Hazeu, W.; Bos, P.; Kuenen, J. G. (1992): Purification and partial characterization of a thermostable trithionate hydrolase from the acidophilic sulphur oxidizer *Thiobacillus acidophilus*. In: *Eur. J. Biochem.* 209 (1), S. 367–374.
- Miles, C. S.; Manson, F. D.; Reid, G. A.; Chapman, S. K. (1993): Substitution of a haem-iron axial ligand in flavocytochrome *b2*. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1202 (1), S. 82–86.
- Mokry, D. Z.; Nadia-Albete, A.; Johnson, M. K.; Lukat-Rodgers, G. S.; Rodgers, K. R.; Lanzilotta, W. N. (2014): Spectroscopic evidence for a 5-coordinate oxygenic ligated high spin ferric heme moiety in the *Neisseria meningitidis* hemoglobin binding receptor. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1840 (10), S. 3058–3066. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.06.009.
- Moreira, D.; Amils, R. (1997): Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov. In: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (2), S. 522–528.
- Mugnol, K. C.U.; Ando, R. A.; Nagayasu, R. Y.; Faljoni-Alario, A.; Brochsztain, S.; Santos, P. S. et al. (2008): Spectroscopic, Structural, and Functional Characterization of the Alternative Low-Spin State of Horse Heart Cytochrome *c*. In: *Biophys. J.* 94 (10), S. 4066–4077. DOI: 10.1529/biophysj.107.116483.

- Müller, F. H.; Bandejas, T. M.; Urich, T.; Teixeira, M.; Gomes, C. M.; Kletzin, A. (2004): Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. In: *Mol. Microbiol.* 53 (4), S. 1147–1160. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04193.x.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1992): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. 1986. In: *Biotechnology* 24, S. 17–27.
- Myers, J. D. (2005): A sulphite respiration system in the chemoheterotrophic human pathogen *Campylobacter jejuni*. In: *Microbiology* 151 (1), S. 233–242. DOI: 10.1099/mic.0.27573-0.
- Nachamkin, I.; Szymanski, C. M.; Blaser, M. J. (2008): *Campylobacter*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press.
- Ogawa, T.; Furusawa, T.; Nomura, R.; Seo, D.; Hosoya-Matsuda, N.; Sakurai, H.; Inoue, K. (2008): SoxAX binding protein, a novel component of the thiosulfate-oxidizing multienzyme system in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. In: *J. Bacteriol.* 190 (18), S. 6097–6110. DOI: 10.1128/JB.00634-08.
- Ohmine, M.; Matsuura, K.; Shimada, K.; Alric, J.; Verméglio, A.; Nagashima, K. V. P. (2009): Cytochrome *c4* can be involved in the photosynthetic electron transfer system in the purple bacterium *Rubrivivax gelatinosus*. In: *Biochemistry* 48 (38), S. 9132–9139. DOI: 10.1021/bi901202m.
- Pearson, R. G.; Songstad, J. (1967): Application of the Principle of Hard and Soft Acids and Bases to Organic Chemistry. In: *J. Am. Chem. Soc.* 89 (8), S. 1827–1836. DOI: 10.1021/ja00984a014.
- Pettigrew, G. W.; Moore, G. R. (1987): *Cytochromes c. Biological aspects*. Berlin, New York: Springer-Verlag (Springer series in molecular biology).
- Pfennig, N. (1992): *The family Chromatiaceae*. New York: Springer.
- Pittman, M. S.; Elvers, K. T.; Lee, L.; Jones, M. A.; Poole, R. K.; Park, S. F.; Kelly, D. J. (2007): Growth of *Campylobacter jejuni* on nitrate and nitrite: electron transport to NapA and NrfA via NrfH and distinct roles for NrfA and the globin Cgb in protection against nitrosative stress. In: *Mol. Microbiol.* 63 (2), S. 575–590. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05532.x.

- Podgorsek, L.; Imhoff, J. F. (1999): Tetrathionate production by sulfur oxidizing bacteria and the role of tetrathionate in the sulfur cycle of Baltic Sea sediments. In: *Aquat. Microb. Ecol.* (17), S. 255–265.
- Protze, J.; Müller, F.; Lauber, K.; Naß, B.; Mentele, R.; Lottspeich, F.; Kletzin, A. (2011): An Extracellular Tetrathionate Hydrolase from the Thermoacidophilic Archaeon *Acidianus ambivalens* with an Activity Optimum at pH 1. In: *Front. Microbiol.* 2. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00068.
- Ran, Y.; Zhu, H.; Liu, M.; Fabian, M.; Olson, J. S.; Aranda, R. et al. (2007): Bis-methionine Ligation to Heme Iron in the Streptococcal Cell Surface Protein Shp Facilitates Rapid Hemin Transfer to HtsA of the HtsABC Transporter. In: *J. Biol. Chem.* 282 (43), S. 31380–31388. DOI: 10.1074/jbc.M705967200.
- Raphael, A. L.; Gray, H. B. (1989): Axial ligand replacement in horse heart cytochrome *c* by semisynthesis. In: *Proteins* 6 (3), S. 338–340. DOI: 10.1002/prot.340060316.
- Ravot, G.; Ollivier, B.; Magot, M.; Patel, B.; Crolet, J.; Fardeau, M.; Garcia, J. (1995): Thio-sulfate reduction, an important physiological feature shared by members of the order thermotogales. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (5), S. 2053–2055.
- Reedy, C. J.; Elvekrog, M. M.; Gibney, B. R. (2007): Development of a heme protein structure electrochemical function database. In: *Nucleic Acids Res.* 36 (Database), S. D307–D313. DOI: 10.1093/nar/gkm814.
- Reijerse, E. J.; Sommerhalter, M.; Hellwig, P.; Quentmeier, A.; Rother, D.; Laurich, C. et al. (2007): The Unusual Redox Centers of SoxXA, a Novel *c*-Type Heme-Enzyme Essential for Chemotrophic Sulfur-Oxidation of *Paracoccus pantotrophus*†. In: *Biochemistry* 46 (26), S. 7804–7810. DOI: 10.1021/bi7003526.
- Reuter, J. (2013): Biochemische und enzymkinetische Analyse eines Tetrahäm-Cytochroms des *c*-Typs aus *Marichromatium purpuratum*. Bonn. Bachelorarbeit.
- Roach, M. P.; Pond, A. E.; Thomas, M. R.; Boxer, S. G.; Dawson, J. H. (1999): The Role of the Distal and Proximal Protein Environments in Controlling the Ferric Spin State and in Stabilizing Thiolate Ligation in Heme Systems: Thiolate Adducts of the Myoglobin H93G Cavity Mutant. In: *J. Am. Chem. Soc.* 121 (51), S. 12088–12093. DOI: 10.1021/ja9915504.

- Rodrigues, M. L.; Oliveira, T. F.; Pereira, I. A. C.; Archer, M. (2006): X-ray structure of the membrane-bound cytochrome *c* quinol dehydrogenase NrfH reveals novel haem coordination. In: *EMBO J.* 25 (24), S. 5951–5960. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601439.
- Rother, D.; Friedrich, C. G. (2002): The cytochrome complex SoxXA of *Paracoccus pantotrophus* is produced in *Escherichia coli* and functional in the reconstituted sulfur-oxidizing enzyme system. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1598 (1-2), S. 65–73.
- Roy, H.; Trudinger, P. A. (1970): The biochemistry of inorganic compounds of sulfur. Cambridge.
- Schook, L. B.; Berk, R. S. (1979): Partial purification and characterization of thiosulfate oxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. In: *J. Bacteriol.* 140 (1), S. 306–308.
- Schweitzer-Stenner, R.; Shah, R.; Hagarman, A.; Dragomir, I. (2007): Conformational states of horse heart cytochrome *c* exhibit different thermal unfolding of the heme cavity. In: *J. Phys. Chem. B* 111 (32), S. 9603–9607. DOI: 10.1021/jp069022j.
- Seel, W. (2012): Klonierung und Expression potentieller Thiosulfatdehydrogenasegene aus *Wolinella succinogenes* in *Escherichia coli*. Bonn. Bachelorarbeit.
- Segel, I. H. (1993): Enzyme kinetics. Davis, California: Wiley Classics Library.
- Sellars, M. J.; Hall, S. J.; Kelly, D. J. (2002): Growth of *Campylobacter jejuni* supported by respiration of fumarate, nitrate, nitrite, trimethylamine-N-oxide, or dimethyl sulfoxide requires oxygen. In: *J. Bacteriol.* 184 (15), S. 4187–4196.
- Shi, W.; Hoganson, C. W.; Espe, M.; Bender, C. J.; Babcock, G. T.; Palmer, G. et al. (2000): Electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance spectroscopic identification and characterization of the tyrosyl radicals in prostaglandin H synthase 1. In: *Biochemistry* 39 (14), S. 4112–4121.
- Sielaff, B.; Andreesen, J. R. (2005): Analysis of the nearly identical morpholine monooxygenase-encoding *mor* genes from different *Mycobacterium* strains and characterization of the specific NADH. Ferredoxin oxidoreductase of this cytochrome P450 system. In: *Microbiology* 151 (Pt 8), S. 2593–2603. DOI: 10.1099/mic.0.28039-0.
- Siemen, A. (2011): Biochemische Untersuchungen an chemolithotrophen Schwefeloxidierern: Charakterisierung der Thiosulfatdehydrogenase aus *Thiomonas intermedia*. Bonn. Bachelorarbeit.

- Smith, A. J. (1966): The role of tetrathionate in the oxidation of thiosulphate by *Chromatium* sp. strain D. In: *J. Gen. Microbiol.* 42 (3), S. 371–380.
- Smith, A. T.; Marvin, K. A.; Freeman, K. M.; Kerby, R. L.; Roberts, G. P.; Burstyn, J. N. (2012): Identification of Cys94 as the distal ligand to the Fe(III) heme in the transcriptional regulator RcoM-2 from *Burkholderia xenovorans*. In: *J. Biol. Inorg. Chem.* 17 (7), S. 1071–1082. DOI: 10.1007/s00775-012-0920-1.
- Sorokin, D. Y. (1993): Oxidation of thiosulfate to tetrathionate by the marine *pseudomonad* ChG 7-3: effects on growth and characterization of the oxidation system. In: *Mikrobiologiya* (62), S. 223–230.
- Sperling, D. (2001): Molekularbiologische Untersuchungen zum Schwefelstoffwechsel in *Allochromatium vinosum*, *Archaeoglobus fulgidus* und *Archaeoglobus veneficus*. Bonn. Dissertation.
- Starkenburger, S. R.; Larimer, F. W.; Stein, L. Y.; Klotz, M. G.; Chain, P. S.G.; Sayavedra-Soto, L. A. et al. (2008): Complete genome sequence of *Nitrobacter hamburgensis* X14 and comparative genomic analysis of species within the genus *Nitrobacter*. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (9), S. 2852–2863. DOI: 10.1128/AEM.02311-07.
- Suga, M.; Lai, T.-L.; Sugiura, M.; Shen, J.-R.; Boussac, A. (2013): Crystal structure at 1.5Å resolution of the PsbV2 cytochrome from the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. In: *FEBS Lett.* 587 (19), S. 3267–3272. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.08.023.
- Thauer, R. K.; Jungermann, K.; Decker, K. (1977): Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. In: *Bacteriol. Rev.* 41 (1), S. 100–180.
- Thiennimitr, P.; Winter, S. E.; Winter, M. G.; Xavier, M. N.; Tolstikov, V.; Huseby, D. L. et al. (2011): Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (42), S. 17480–17485. DOI: 10.1073/pnas.1107857108.
- Thomas, P. E.; Ryan, D.; Levin, W. (1976): An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. In: *Anal. Biochem.* 75 (1), S. 168–176.
- Trudinger, P. A. (1958): Cytochromes and thiosulphate oxidation in an aerobic *Thiobacillus*. In: *Biochim. Biophys. Acta* 30 (1), S. 211–212.

- Trudinger, P. A. (1961): Thiosulphate oxidation and cytochromes in *Thiobacillus X. 1*. fractionation of bacterial extracts and properties of cytochromes. In: *Biochem. J.* 78, S. 673–680.
- Trudinger, P. A. (1967): Metabolism of thiosulfate and tetrathionate by heterotrophic bacteria from soil. In: *J. Bacteriol.* 93 (2), S. 550–559.
- Tuttle, J. H. (1980): Thiosulfate Oxidation and Tetrathionate Reduction by Intact Cells of Marine Pseudomonad Strain 16B. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 39 (6), S. 1159–1166.
- Ukita, S.; Fujii, T.; Hira, D.; Nishiyama, T.; Kawase, T.; Migita, C. T.; Furukawa, K. (2010): A heterodimeric cytochrome *c* complex with a very low redox potential from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture. In: *FEMS Microbiol. Lett.* 313 (1), S. 61–67. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02122.x.
- Urban, P. J. (1961): Colorimetry of Sulphur anions (180), S. 161.
- van Beeumen, J. (1991): Primary structure diversity of prokaryotic diheme cytochromes *c*. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1058 (1), S. 56–60.
- van Driessche, G.; Devreese, B.; Fitch, J. C.; Meyer, T. E.; Cusanovich, M. A.; van Beeumen, J. (2006): GHP, a new *c*-type green heme protein from *Halochromatium salexigens* and other proteobacteria. In: *FEBS Journal* 273 (12), S. 2801–2811. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05296.x.
- van Gelder, B.; Slater, E. C. (1962): The extinction coefficient of cytochrome *c*. In: *Biochim. Biophys. Acta* 58, S. 593–595.
- van Helmont, S. (2012): Charakterisierung der Thiosulfatdehydrogenase aus *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588. Bonn. Bachelorarbeit.
- van Wonderen, J. H.; Knight, C.; Oganessian, V. S.; George, S. J.; Zumft, W. G.; Cheesman, M. R. (2007): Activation of the cytochrome *cdI* nitrite reductase from *Paracoccus pantotrophus*. Reaction of oxidized enzyme with substrate drives a ligand switch at heme *c*. In: *J. Biol. Chem.* 282 (38), S. 28207–28215. DOI: 10.1074/jbc.M701242200.
- Verbaro, D.; Hagarman, A.; Soffer, J.; Schweitzer-Stenner, R. (2009): The pH dependence of the 695 nm charge transfer band reveals the population of an intermediate state of the alkaline transition of ferricytochrome *c* at low ion concentrations. In: *Biochemistry* 48 (13), S. 2990–2996. DOI: 10.1021/bi802208f.

- Verméglio, A.; Li, J.; Schoepp-Cothenet, B.; Pratt, N.; Knaff, D. B. (2002): The role of high-potential iron protein and cytochrome *c*(8) as alternative electron donors to the reaction center of *Chromatium vinosum*. In: *Biochemistry* 41 (28), S. 8868–8875.
- Vincent, K. A.; Tilley, G. J.; Quammie, N. C.; Streeter, I.; Burgess, B. K.; Cheesman, M. R.; Armstrong, F. A. (2003): Instantaneous, stoichiometric generation of powerfully reducing states of protein active sites using Eu(II) and polyaminocarboxylate ligands. In: *Chem. Commun.* (20), S. 2590–2591.
- Visser, J. M.; de Jong, G A; Robertson, L. A.; Kuenen, J. G. (1996): Purification and characterization of a periplasmic Thiosulfate dehydrogenase from the obligately autotrophic *Thiobacillus sp.* W5. In: *Arch. Microbiol.* 166 (6), S. 372–378.
- Weingarten, R. A.; Taveirne, M. E.; Olson, J. W. (2009): The dual-functioning fumarate reductase is the sole succinate:quinone reductase in *Campylobacter jejuni* and is required for full host colonization. In: *J. Bacteriol.* 191 (16), S. 5293–5300. DOI: 10.1128/JB.00166-09.
- Weissgerber, T.; Zigann, R.; Bruce, D.; Chang, Y. J.; Detter, J. C.; Han, C. et al. (2011): Complete genome sequence of *Allochromatium vinosum* DSM 180(T). In: *Stand. Genomic Sci.* 5 (3), S. 311–330. DOI: 10.4056/sigs.2335270.
- Wentzien, S. (2002): Thiosulfat- und Polythionatstoffwechsel bei *Thiomonas intermedia* K12. Hamburg. Dissertation.
- Wentzien, S.; Sand, W. (2004): Tetrathionate Disproportionation by *Thiomonas intermedia* K12. In: *Eng. Life Sci.* 4 (1), S. 25–30. DOI: 10.1002/elsc.200400007.
- Whited, G. M.; Tuttle, J. H. (1983): Separation and distribution of thiosulfate-oxidizing enzyme, tetrathionate reductase, and thiosulfate reductase in extracts of marine heterotroph strain 16B. In: *J. Bacteriol.* 156 (2), S. 600–610.
- Winogradsky, S. N. (1887): Über Schwefelbakterien. In: *Botanische Zeitung* (45), S. 489–508.
- Winter, S. E.; Thiennimitr, P.; Winter, M. G.; Butler, B. P.; Huseby, D. L.; Crawford, R. W. et al. (2010): Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. In: *Nature* 467 (7314), S. 426–429. DOI: 10.1038/nature09415.
- Young, K. T.; Davis, L. M.; Dirita, V. J. (2007): *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. In: *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (9), S. 665–679. DOI: 10.1038/nrmicro1718.

Yukl, E. T.; Williamson, H. R.; Higgins, L.-A.; Davidson, V. L.; Wilmot, C. M. (2013): Oxidative damage in MauG: implications for the control of high-valent iron species and radical propagation pathways. In: *Biochemistry* 52 (52), S. 9447–9455. DOI: 10.1021/bi401441h.

Zehnder, A. J.; Wuhrmann, K. (1976): Titanium (III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. In: *Science* 194 (4270), S. 1165–1166.

Zhong, F.; Lisi, G. P.; Collins, D. P.; Dawson, J. H.; Pletneva, E. V. (2014): Redox-dependent stability, protonation, and reactivity of cysteine-bound heme proteins. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (3), S. E306–E315. DOI: 10.1073/pnas.1317173111.

Tabelle S 1: Vergleich kinetischer Parameter der Thiosulfat-Oxidation und Tetrathionat-Reduktion durch das AvTsdA Wildtyp-Protein und AvTsdA-Varianten

Reaktion	Thiosulfat --> Ferricyanid				Thiosulfat --> Ferricyanid				Tetrathionat --> Methylviologen			
	pH 4.0				pH 5.0				pH 5.0			
Parameter	$V_{max}$	$k_{cat}$	$S_{[0.5]}$	$k_{cat}/S_{[0.5]}$	$V_{max}$	$k_{cat}$	$S_{[0.5]}$	$k_{cat}/S_{[0.5]}$	$V_{max}$	$k_{cat}$	$S_{[0.5]}$	$k_{cat}/S_{[0.5]}$
Einheit	U mg <sup>-1</sup>	s <sup>-1</sup>	mM	mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	U mg <sup>-1</sup>	s <sup>-1</sup>	mM	mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	U mg <sup>-1</sup>	s <sup>-1</sup>	mM	mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
TsdA	28600±2500	14000	1,1±0,20	12727	4468±425	2013	0,18±0,06	14061	82,0±3,4	37	1,98±0,32	18,69
TsdAK <sub>208</sub> G	2372±407	1068	1,1±0,50	971	810±92	365	0,46±0,17	793	93,9±10,0	42	1,17±0,40	35,90
TsdAK <sub>208</sub> N	1466±172	660	1,3±0,32	516	778±81	350	0,17±0,06	2059	80,0±17,0	36	3,20±1,40	11,25
TsdAM <sub>209</sub> G	2900±129	1330	0,9±0,11	1478	1695±133	764	1,08±0,22	711	120,8±11,5	54	1,16±0,13	46,67

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei:

- Apl. Prof. Dr. Christiane Dahl für die interessante Themenstellung und gute Betreuung während der Doktorarbeit. Dies beinhaltet insbesondere zahlreiche Anregungen und wissenschaftlichen Austausch während der Arbeit, sowie die oft sehr hilfreiche und konstruktive Kritik zu meinen Arbeiten und Vorträgen. Danke auch für die schnelle Durchführung von verwaltungstechnischen Angelegenheiten sowie die Möglichkeit zweimal nach Portugal zu reisen und zahlreiche Konferenzen während der Doktorarbeit zu besuchen.
- Prof. Dr. Inês A. C. Pereira für die Durchführung der EPR-Spektroskopie, den wissenschaftlichen Diskurs während meiner gesamten Arbeit und die sehr nette Betreuung während meiner beiden Aufenthalte in Oeiras, Portugal. Ein Dank geht auch an ihre Arbeitsgruppe für die Hilfestellung und freundliche Atmosphäre insbesondere an Sofia, welche mir bei der Durchführung zahlreicher Versuche geholfen hat und an André, der mir die portugiesische Kultur und Mentalität näher gebracht hat.
- Prof. Dr. Ricardo O. Louro für die Nutzung des Potentiometers und Anaerobenzeltes in seinem Labor. Ein besonderer Dank auch an Dr. Catarina Paquete, die mir bei der Durchführung der potentiometrischen Redoxpotential-Bestimmung geholfen und alle Ergebnisse dieser mit mir analysiert hat.
- Prof. Dr. Margarida Archer für die Kooperation im Bereich der Kristallographie.
- Dr. José Brito für die Durchführung der Kristallographie und Röntgendiffraktometrie, sowie die sehr hilfreiche wissenschaftliche Auseinandersetzung mit den daraus entstandenen Ergebnissen.
- Prof. Dr. Dave Kelly für die Kooperation zur *Campylobacter jejuni* TsdA und Yang-Wei Liu für die Durchführung der *C. jejuni in vivo* Versuche sowie den wissenschaftlichen Austausch zu allen Ergebnissen den Organismus *C. jejuni* betreffend.
- Prof. Dr. Julea Butt für die Kooperation im Bereich Redoxtitration und Sam Rowe für die Durchführung und Analyse der potentiometrischen Redoxpotential Bestimmung mit Hilfe einer optisch transparenten Zinnoxid-Elektrode.
- Prof. Dr. Uwe Deppenmeier für die freundliche Übernahme des Koreferats.
- Dr. Fabian Grein für die zahlreichen Hilfestellungen und wissenschaftliche Diskussion meiner Ergebnisse im Besonderen zu Beginn meiner Arbeit und in Portugal.

- Den Studenten Anna Siemen, Konrad Kosciow, Johannes Bergmann, Sebastian van Belmont, Tobias Koch, Jula Reuter und Thomas Franke für die Hilfe bei diesem Projekt im Rahmen einer Bachelorarbeit.
- Der „Fun AG Dahl“, namentlich Jeanette Latus, Julia Kurth, Lijun Liu, Dr. Thomas Weißgerber und Dr. Yvonne Stockdreher für eine tolle Zeit in und außerhalb des Labors 126.
- Allen Mitarbeitern des IfMB für die freundliche und nette Arbeitsatmosphäre im Besonderen allen Mitgliedern der Kaffeepause.
- Meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden für die große Unterstützung während der letzten Jahre.
- Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung dieses Projektes (DA 351/7-1).

**Publikationen:**

Denkman K., Grein F., Zigann R., Siemen A., Bergmann J., van Helmont S., Nicolai A., A. C. Pereira I., Dahl C. (2012). Thiosulfate dehydrogenase: a widespread unusual acidophilic *c*-type cytochrome. *Environmental Microbiology* **14**(10), 2673 – 2688

Liu Y.W. & Denkman K., Kosciow K., Dahl C. und J. Kelly D. (2013). Tetrathionate stimulated growth of *Campylobacter jejuni* identifies a new type of bifunctional tetrathionate reductase (TsdA) that is widely distributed in bacteria. *Molecular Microbiology* **88**(1), 173 – 188

Brito J., Guitierrez A., Denkman K., Dahl C. und Archer M. (2014). Production, crystallization und preliminary crystallographic analysis of *Allochro matium vinosum* Thiosulfate dehydrogenase TsdA, an unusual acidophilic *c*-type cytochrome. *Acta Crystallographica Section F* **70**, 1424 - 1427

Brito, J.A., Denkman, K., Pereira, I.A.C., Dahl, C., Archer, M. (2015). Thiosulfate Dehydrogenase (TsdA) from *Allochro matium vinosum*: Structural and Functional Insights into Thiosulfate Oxidation. *Journal of Biological Chemistry* **M114.623397**