

***In vitro* Untersuchung potentieller Ferredoxine  
und Ferredoxin Reduktasen des Myxobakteriums  
*Sorangium cellulosum* So ce56**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

von

**Frau Dipl. Biol. Kerstin Maria Ewen**

Saarbrücken  
2009

**Tag des Kolloquiums:** 17.02.2010

**Dekan:** Prof. Dr.-Ing. Stefan Diebels

**Berichterstatter:** Prof. Dr. Rita Bernhardt

Prof. Dr. Rolf Müller

Prof. Dr. Francesco Bonomi

**Vorsitz:** Prof. Dr. Uli Müller

**Akad. Mitarbeiter:** Dr. Gert-Wieland Kohring

*„Was wir wissen, ist ein Tropfen; was wir nicht wissen,  
ein Ozean.“*

*Sir Isaac Newton*

## **DANKSAGUNG**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Rita Bernhardt angefertigt.

Bei Frau Prof. Dr. Rita Bernhardt bedanke ich mich für die interessante Fragestellung, die stete Diskussionsbereitschaft und das rege Interesse am Fortschritt dieser Arbeit. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, an internationalen Kongressen teilzunehmen.

Herrn Prof. Dr. Rolf Müller (Institut für Pharmazeutische Biotechnologie, Universität des Saarlandes) danke ich für die sehr gute Kooperation, die dieses Forschungsvorhaben erst ermöglicht hat, sowie für die vielen inhaltlichen Impulse.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Frank Hannemann für die konstruktiven Diskussionen und wertvollen Anregungen sowie die stete moralische Unterstützung beim Aufbau meiner „Frustrationstoleranzgrenze“.

Frau Dr. Olena Perlova (Institut für Pharmazeutische Biotechnologie, Universität des Saarlandes) danke ich für die Hilfe bei den bioinformatischen Analysen sowie für die Bereitstellung genomischer DNA. Herrn Dr. Daniel Krug (Institut für Pharmazeutische Biotechnologie, Universität des Saarlandes) sei gedankt für die Durchführung der LC-MS Messungen.

Herrn Dr. Reinhard Kappl (Institut für Biophysik, Universität des Saarlandes, Standort Homburg) möchte ich vielmals danken für seine Zeit und Geduld sowie die vielen nützlichen Hinweise bezüglich ESR-Spektroskopie und natürlich für die Möglichkeit, diese Messungen überhaupt durchführen zu können. Außerdem möchte ich mich für die Simulation der apparenten g-Faktoren bedanken.

Ebenso danke ich Frau Traudel Allgayer (Institut für Anorganische und Analytische Chemie und Radiochemie, Universität des Saarlandes) für die Durchführung der ICP-OES Messungen.

Herrn Prof. Dr. Francesco Bonomi und Frau a.o. Prof. Dr. Stefania Iametti (DISMA, Universität Mailand, Italien) danke ich für die anregenden Gespräche und nützlichen Tipps

## **DANKSAGUNG**

hinsichtlich des Arbeitens mit Ferredoxinen ebenso wie Herrn Prof. Dr. Carlos Gómez-Moreno und Frau a.o. Prof. Dr. Milagros Medina (Institut für Biochemie, Molekular- und Zellbiologie, Universität Saragossa, Spanien) für ihre Anregungen und Vorschläge für die Charakterisierung der Flavoproteine. Bei Herrn Prof. Dr. Pedro Almeida de Oliveira (Institut für physikalische Chemie, Universität Paris-Süd 11) möchte ich mich bedanken für seine Diskussionsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und natürlich die Chance, Experimente in seinem Labor durchzuführen.

Des weiteren bedanke ich mich bei Frau Katharina Bompais, Herrn Wolfgang Reinle und Herrn Walter Klose für die Bereitstellung der mitochondrialen Proteine sowie für die vielen großen und kleinen Ratschläge im Laufe der Jahre. Auch Frau Gabi Schon möchte ich für ihre Unterstützung und Hilfe bei organisatorischen Fragen und Problemen danken.

Allen jetzigen und früheren Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für das angenehme Arbeitsklima und den Spaß, den wir zusammen im Labor hatten; besonders möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Herrn Dipl. Biol. Martin Wörner für die Unterstützung auf dem Gebiet der isoelektrischen Fokussierung und bei Frau Dipl. Chem. Sabrina Bleif sowie Herrn Dipl. Chem. Michael Ringle für ihre Hilfe bei den HPLC-Messungen bedanken. Ein ganz besonderes Dankeschön für die hervorragende Zusammenarbeit geht auch an meinen langjährigen Mitstreiter im „Myxo-Projekt“ Herrn M. Sc. med. microbiol. Yogan Kathri. Außerdem danke ich Herrn Dr. Frank Hannemann, Herrn Dr. Andreas Bichet und Frau M. Sc. Biotech. Anna Hobler für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Auch bedanke ich mich für das mir gewährte LGF-Stipendium, das die vorliegende Arbeit überhaupt ermöglichte.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht auch an Herrn Dr. Andreas Bichet, der mich stets motiviert hat und mir immer mit Geduld, Diskussionsbereitschaft und gutem Rat beistand.

Zum Schluss bedanke ich mich auch ganz herzlich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich in jeder nur erdenklichen Weise unterstützt und immer wieder ermutigt haben, meine Ziele zu verfolgen.

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
	<b>Abkürzungen für Aminosäuren.....</b>	<b>VII</b>
	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>VIII</b>
	<b>Summary.....</b>	<b>IX</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Cytochrom P450 Systeme.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2.</b>	<b>Eisen-Schwefel-Proteine und Ferredoxine.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.</b>	<b>Flavoproteine.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.</b>	<b>Myxobakterien.....</b>	<b>17</b>
<b>1.5.</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>20</b>
<b>2.</b>	<b>Materialien und Methoden.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1.</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>21</b>
2.1.1.	Genomische DNA von <i>Sorangium cellulosum</i> So ce56.....	21
2.1.2.	Oligonukleotide.....	21
2.1.3.	Expressionsplasmide und <i>E. coli</i> Stämme.....	21
2.1.4.	Andere verwendete Proteine.....	23
<b>2.2.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>24</b>
2.2.1.	Bioinformatische Methoden.....	24
2.2.2.	Gentechnische Manipulationen.....	28
2.2.2.1.	Amplifikation der ausgewählten Gene.....	28
2.2.2.2.	Isolierung der DNA-Fragmente und Ligation.....	28
2.2.2.3.	Plasmidreinigung und DNA-Konzentrationsbestimmung.....	29
2.2.2.4.	DNA-Sequenzierung.....	29
2.2.2.5.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen und Transformation.....	29
2.2.2.6.	Bakterienkultivierung und heterologe Proteinexpression.....	30
2.2.3.	Proteinreinigung.....	30

2.2.3.1. Reinigung <i>His<sub>6</sub>-getaggtter</i> Proteine.....	31
2.2.3.2. Reinigung <i>GST-getaggtter</i> Proteine.....	31
2.2.3.3. Reinigung von Einschlusskörpern (Inclusion bodies, ICB) des Fdx7.....	32
2.2.3.4. Ortsgerichtete Mutagenese, Expression und Reinigung von <i>S. pombe</i> Arh1.....	33
2.2.4. Proteinanalysen.....	34
2.2.4.1. Proteinbestimmung.....	34
2.2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
2.2.4.3. Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	34
2.2.5. Spektroskopische Untersuchungen.....	35
2.2.5.1. UV/Vis-Spektroskopie.....	35
2.2.5.2. CD-Spektroskopie.....	35
2.2.5.3. ESR-Spektroskopie.....	36
2.2.6. Untersuchung der prostethischen Gruppen.....	37
2.2.6.1. Qualitative Flavinbestimmung mittels LC-MS.....	37
2.2.6.2. Quantitative Flavinbestimmung mittels UV/Vis-Spektroskopie.....	37
2.2.6.3 Eisenbestimmung mittels ICP-OES.....	38
2.2.7. Reaktion der Ferredoxin Reduktasen mit NAD(P)H: Ferricyanide Assay.....	39
2.2.8. Untersuchung potentieller Protein-Protein Interaktionen in Cytochrom P450 Systemen mittels <i>in vitro</i> Rekonstitution.....	39
2.2.8.1. CYP11A1 abhängiger Substratumsatz.....	39
2.2.8.2. CYP260A1 abhängiger Substratumsatz.....	40
2.2.8.3. Messung des NADPH Verbrauchs beim CYP260A1 abhängigen Substratumsatz.....	41
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1. Bioinformatische Analysen.....</b>	<b>42</b>
3.1.1. Untersuchung der <i>Sorangium cellulosum</i> So ce56 Ferredoxine.....	43
3.1.2. Untersuchung der <i>Sorangium cellulosum</i> So ce56 Ferredoxin Reduktasen.....	50
<b>3.2. Expressionsstrategie und Reinigung.....</b>	<b>55</b>
<b>3.3. Charakterisierung der Ferredoxine aus <i>S. cellulosum</i> So ce56.....</b>	<b>62</b>

3.3.1.	UV/Vis-Spektroskopie.....	62
3.3.2.	CD-Spektroskopie.....	64
3.3.3.	ESR-Spektroskopie.....	68
3.3.4.	Isoelektrische Fokussierung.....	72
3.3.5.	Eisenbestimmung mittels ICP-OES .....	74
<b>3.4.</b>	<b>Charakterisierung der Ferredoxin Reduktasen aus <i>S. cellulorum</i> So ce56...</b>	<b>75</b>
3.4.1.	UV/Vis-Spektroskopie .....	75
3.4.1.1.	UV/Vis-Spektroskopie der Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB im oxidierten Zustand.....	75
3.4.1.2.	UV/Vis-Spektroskopie der FdRA bei Reduktion.....	77
3.4.1.3.	UV/Vis-Spektroskopie der FdRB bei Reduktion.....	81
3.4.2.	CD-Spektroskopie.....	84
3.4.3.	ESR-Spektroskopie.....	86
3.4.4.	Isoelektrische Fokussierung der <i>S. cellulorum</i> So ce56 Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB.....	89
3.4.5.	Untersuchung der prosthetischen Gruppe der <i>S. cellulorum</i> So ce56 Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB.....	91
3.4.5.1.	Identifikation der Flavinkomponente.....	91
3.4.5.2.	Bestimmung des FAD Gehaltes.....	93
3.4.6.	Reaktion der <i>S. cellulorum</i> So ce56 Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB mit NAD(P)H: Ferricyanid Assay.....	94
<b>3.5.</b>	<b>Interaktion der Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen aus <i>S. cellulorum</i> So ce56 – Rekonstitution von CYP Klasse I Systemen .....</b>	<b>95</b>
3.5.1.	Rekonstitution eines Cytochrom P450 Klasse I Systems mit CYP11A1.....	95
3.5.2.	Rekonstitution eines Cytochrom P450 Klasse I Systems mit CYP260A1.....	98
3.5.2.1.	CYP260A1 abhängige Umsetzung von Nootkaton.....	98
3.5.2.2.	NADPH Verbrauch der identifizierten myxobakteriellen Klasse I Systeme.....	103
<b>4.</b>	<b>Diskussion und Ausblick.....</b>	<b>104</b>
<b>4.1.</b>	<b>Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen aus <i>Sorangium cellulorum</i> So ce56.....</b>	<b>106</b>
<b>4.2.</b>	<b>Interaktion der Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen .....</b>	<b>112</b>



4.3.	FdRB.....	115
4.4.	Fdx1.....	117
4.5.	Fdx2 und Fdx8 .....	124
4.6.	Ausblick.....	129
5.	Literaturverzeichnis.....	132
6.	Anhang.....	150
6.1.	Ergebnisse der Blast Suche.....	150
6.2.	Oligonukleotide.....	152
6.3.	Verwendete Plasmide.....	155
6.4.	Abgeleitete Aminosäuresequenzen der Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen aus <i>Sorangium cellulosum</i> So ce56.....	158
6.5.	Schmelzkurven der <i>S. cellulosum</i> So ce56 Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen.....	161
6.6.	Veröffentlichungen.....	162

**Abkürzungsverzeichnis**

7-DHC	7-Dehydrocholesterol
7-DHP	7-Dehydropregnenolon
AdR	Adrenodoxin Reduktase
Adx	Adrenodoxin
Arh1	Adrenodoxin Reduktase Homolog 1
bp	Basenpaare
CD	Circulardichroismus
CPR	Cytochrom P450 Reduktase
CYP	Cytochrom P450
DTE	Dithioerythritol
EIC	Extracted Ion Chromatogram
ESR	Elektronenspinresonanz
Etp1 <sup>fd</sup>	Electron Transport Protein 1 Ferredoxin Domain
F	Cortisol
FAD	Flavinadenindinukleotid
FdR	Ferredoxin Reduktase
Fdx	Ferredoxin
Fldx	Flavodoxin
FMN	Flavinmononukleotid
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HiPIP	High Potential Iron Protein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
IEF	isoelektrische Fokussierung
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
ISC	Iron Sulfur Cluster
kb	Kilobasen
kcat	Wechselzahl
kD	Kilodalton

KM	Michaelis-Menten Konstante
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute
MW	Molecular Weight
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
OFOR	2-Oxoacid:Ferredoxin Oxidoreduktase
ori	Origin of replication
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PdR	Putidaredoxin Reduktase
Pdx	Putidaredoxin
PFOR	Phthalat Dioxygenase Reduktase
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q-Wert	Reinheitsindex bei Fdx der Quotient $A_{\text{Fdx-typisches Maximum}}/A_{276\text{nm}}$ bei FdR der Quotient $A_{276\text{nm}}/A_{\text{FdR-typisches Maximum}}$
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T <sub>m</sub>	Halbunwandlungstemperatur
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV/Vis	Ultravioletter und visueller Wellenlängenbereich
WT	Wildtyp

**Abkürzungen für Aminosäuren**

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

## Zusammenfassung

Myxobakterien – insbesondere Mitglieder des Genus *Sorangium* – sind für ihr biotechnologisches Potential als Produzenten pharmazeutisch wichtiger Sekundärmetabolite bekannt. Cytochrome P450 (CYPs) sind in die Bildung verschiedener myxobakterieller Substanzen involviert. Da die in Bakterien verbreiteten Klasse I CYPs auf Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen als Elektronenmediatorproteine angewiesen sind, wurden entsprechende Kandidaten in der *S. cellulosum* So ce56 Genomsequenz identifiziert. Es wurden acht Ferredoxine (Fdx1-8) und zwei Ferredoxin Reduktasen (FdRA/B) kloniert, heterolog exprimiert und charakterisiert. Die unterschiedlichen Fdx–FdR Kombinationen wurden hinsichtlich des Elektronentransfers untereinander und ihrer Aktivität in CYP Systemen untersucht. Zwei Ferredoxine übertrugen Elektronen auf das endogene *S. cellulosum* So ce56 CYP260A1 und konnten von beiden Ferredoxin Reduktasen reduziert werden, so dass die CYP260A1 katalysierte Reaktion insgesamt von vier Fdx-FdR Kombinationen unterstützt wurde. Diese Variabilität des Elektronentransportweges könnte *in vivo* von Bedeutung für die Regulation der CYP Aktivität sein. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die Elektronentransferkette aus FdRB und Fdx1 zwar nicht mit CYP260A1 arbeitet, jedoch die Aktivität des heterologen CYP11A1 aus Säugern unterstützt. Fdx1 ist das erste bakterielle Fdx, das mit diesem Säuger CYP eine funktionelle Redoxkette bildet.

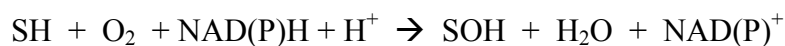
## Summary

Myxobacteria – especially members of the genus *Sorangium* – are known for their biotechnological potential as producers of pharmaceutically valuable secondary metabolites. The biosynthesis of several of those myxobacterial compounds includes cytochrome P450 (CYP) activity. As class I CYPs occur wide-spread in bacteria and rely on ferredoxins and ferredoxin reductases as essential electron mediators respective candidates were identified in the genome of *S. cellulosum* So ce56. In this work eight ferredoxins (Fdx1-8) and two ferredoxin reductases (FdRA/B) were cloned, heterologously expressed and characterized. The different Fdx-FdR combinations were investigated with respect to electron transfer activity from FdR to Fdx as well as in CYP systems. Two ferredoxins were able to sustain the catalytic activity of the endogenous *S. cellulosum* So ce56 P450 CYP260A1 and were able to receive electrons from both ferredoxin reductases, resulting in four Fdx-FdR combinations able to deliver electrons to CYP260A1. This variability of the CYP electron transfer pathways might be of physiological relevance with respect to the regulation of CYP activity. Moreover, the electron transport chain FdRB-Fdx1 was demonstrated to support the heterologous mammalian CYP11A1, although it didn't sustain the catalytic activity of the autologous CYP260A1. Fdx1 is the first bacterial Fdx shown to functionally interact with mammalian CYP11A1.

# 1. Einleitung

## 1.1. Cytochrom P450 Systeme

Cytochrom P450 (CYP) Enzyme bilden eine Superfamilie externer Monooxygenasen, deren Mitglieder in allen biologischen Reichen zu finden sind (Bernhardt und Waterman, 2007). Wie die Bezeichnung „Monooxygenase“ impliziert, handelt es sich bei Cytochromen P450 um Enzyme, die molekularen Sauerstoff reduzieren und eines der Sauerstoffatome in das Substrat einbauen. Das zweite Sauerstoffatom hingegen geht als Wasser aus der Reaktion hervor. Als „externe Monooxygenasen“ beziehen die Cytochrome P450 die für diese Reaktion benötigten Reduktionsäquivalente nicht vom Substrat selbst, sondern von externen Elektronendonoren (in der Regel NAD(P)H). Somit katalysieren Cytochrome P450 Reaktionen des folgenden Typs:



(Dabei steht SH für das Substrat und SOH für das hydroxylierte Substrat.)

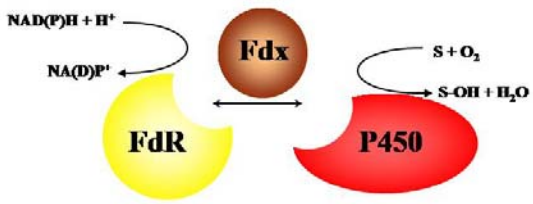
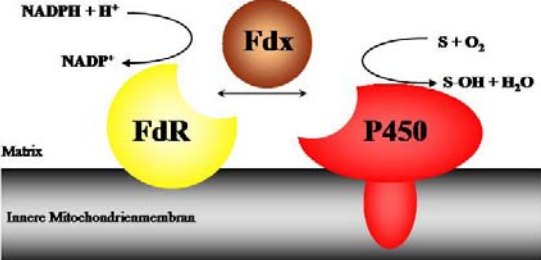

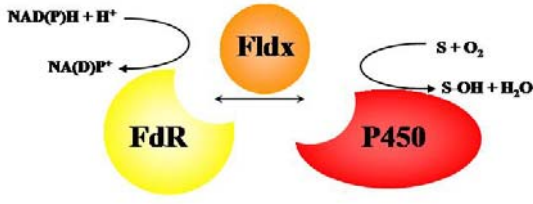
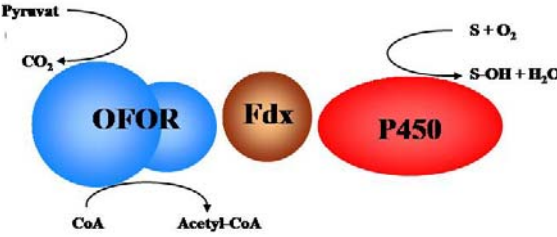
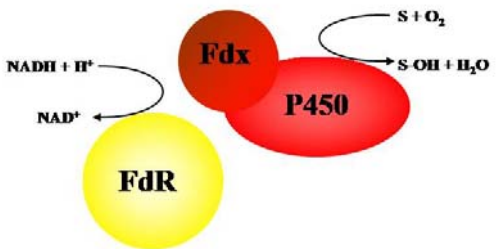
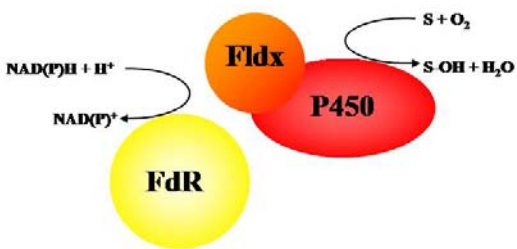
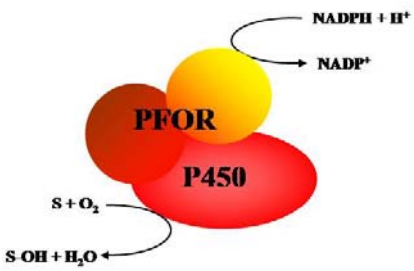

Die von Cytochromen P450 katalysierten Reaktionen weisen eine große Diversität auf; so wurden neben Hydroxylierungen beispielsweise auch N-, O-, und S-Desalkylierungen, Sulfoxidierungen, Epoxidierungen, Desaminierungen, Desulfurierungen, Dehalogenierungen, Peroxidierungen und N-Oxid-Reduktionen beschrieben (Bernhardt, 1996). Aufgrund dieser katalytischen Vielseitigkeit sind Angehörige der Cytochrom P450 Enzymfamilie auch an so unterschiedlichen biologischen Prozessen wie der Biosynthese von Steroidhormonen in Säugetieren, von Phyto- und Insektenhormonen, der Assimilierung von Kohlenstoffquellen und der Metabolisierung von Xenobiotika wie beispielsweise Arzneistoffen beteiligt (Bernhardt, 1996; Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000; Bernhardt, 2006; Bernhardt und Waterman, 2007). Aber Cytochrome P450 spielen auch eine Rolle im Biosyntheseweg vieler Naturstoffe (Bernhardt, 2006), da dort oft Modifikationen an Terpen- bzw. Polyketidgrundkörpern (Haudenschild *et al.*, 2000; Jennewein *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007; Kirby und Keasling, 2008) vorgenommen werden. Betrachtet man beispielsweise pharmakologisch relevante Sekundärmetabolite bakteriellen Ursprungs, so ist bei *Streptomyces*-Arten oftmals die Cytochrom P450 abhängige Oxidation von Vorläufermolekülen von Makrolidantibiotika ein wesentlicher Schritt (Guengerich, 2002;

Podust *et al.*, 2003; Sielaff und Andreesen, 2005b; Zhao *et al.*, 2008). Aber auch bei einigen Naturstoffen aus Myxobakterien wurde die Beteiligung von Cytochrom P450 Systemen an der Biosynthese nachgewiesen. Dabei handelt es sich um die antineoplastischen Epothilone (Ogura *et al.*, 2004), die antifungalen Leupyrrine (Bode *et al.*, 2004) und die ebenfalls cytotoxischen Spirangiene (Frank *et al.*, 2007a) aus *Sorangium cellulosum* Stämmen. Daneben weiß man auch von zwei Antibiotika (Myxovirescin aus *Myxococcus* (Simunovic *et al.*, 2006) und Aurafuron aus *Stigmatella aurantiaca* (Frank *et al.*, 2007b)), den antifungalen Ajudazolen (aus *Chondromyces crocatus* (Buntin *et al.*, 2008)) und dem Elektronentransportinhibitor Stigmatellin ((Gaitatzis *et al.*, 2002), ebenfalls aus *Stigmatella aurantiaca*), dass Cytochrome P450 an ihrer Bildung beteiligt sind.

Wie bereits erwähnt, benötigen Cytochrome P450 als externe Monooxygenasen normalerweise einen externen Elektronendonator; allerdings können die Cytochrome P450 meist nicht direkt mit dem externen Elektronendonator interagieren. Deswegen werden in fast allen Cytochrom P450 Systemen neben dem eigentlichen Enzym noch ein oder zwei zusätzliche Proteine benötigt, um Elektronen vom primären Elektronendonator – im Regelfall NAD(P)H – auf das Cytochrom P450 zu übertragen. Hinsichtlich ihres Elektronentransportsystems lassen sich die Cytochrome P450 in mehrere Klassen einteilen (vgl. Abbildung 1.1). Die beiden Hauptklassen umfassen den mitochondrialen/bakteriellen Typ der Cytochrom P450 Systeme (Klasse I), in dem die Elektronen von NAD(P)H über eine Ferredoxin Reduktase und ein Ferredoxin zum Cytochrom P450 fließen, und den mikrosomalen Typ (Klasse II), bei dem die Cytochrom P450 Enzyme die benötigten Elektronen von NADPH über eine Diflavin-Cytochrom P450 Reduktase erhalten. Daneben existiert besonders bei Prokaryoten noch eine Reihe ungewöhnlicher Elektronentransportsysteme, die andere Komponenten enthalten oder bei denen einzelne Komponenten der Cytochrom P450 Systeme fusioniert sind (McLean *et al.*, 2005; Hannemann *et al.*, 2007).

Diese Vielzahl an möglichen Elektronentransportsystemen erschwert die Suche nach den Komponenten einzelner, neuer Cytochrom P450 Systeme, zumal die entsprechenden Gene mitunter nicht in räumlicher Nähe zueinander lokalisiert sind, sondern über das Genom verstreut vorliegen (Parajuli *et al.*, 2004; Bell *et al.*, 2006). Trotzdem ist es sinnvoll, auch *in vitro* die natürlichen Redoxpartner zu verwenden, da bei der Rekonstitution einer heterologen Elektronentransferkette die Effizienz der Elektronenübertragung oftmals gering ist oder aber die Redoxkette insgesamt nicht funktionell ist (Hannemann *et al.*, 2007).



 <p>A) Klasse I, bakteriell</p>	 <p>B) Klasse I, mitochondrial</p>
 <p>C) Klasse II, mikrosomal</p>	
 <p>D) Klasse III, bakteriell</p>	 <p>E) Klasse IV, bakteriell</p>
 <p>F) Klasse V, bakteriell</p>	 <p>G) Klasse VI, bakteriell</p>
 <p>H) Klasse VII, bakteriell</p>	 <p>I) Klasse VIII, bakteriell</p>

**Abbildung 1.1: Einteilung der Cytochrom P450 Systeme nach ihrem Elektronentransportsystem (modifiziert nach (Hannemann *et al.*, 2007))**

Dargestellt sind die Cytochrom P450 Systeme, die auf zusätzliche Proteine für den Elektronentransfer angewiesen sind, bzw. bei denen die Cytochrom P450 Domäne mit entsprechenden zusätzlichen Domänen fusioniert ist. Bei den bakteriellen Systemen sind alle Komponenten des Systems löslich und befinden sich im Cytoplasma (A,D-I), bei den eukaryotischen Systemen sind die Cytochrome P450 normalerweise membrangebunden, die Flavoproteinkomponente membrangebunden (C) oder membranassoziiert (B).

Die Abkürzungen der Redoxkomponenten stehen für: Fdx - Ferredoxin (Redoxzentrum: Eisen-Schwefel-Cluster); FdR, Ferredoxin Reduktase (Redoxzentrum: FAD); CPR, Cytochrom P450 Reduktase (Redoxzentren: FAD, FMN); Fldx, Flavodoxin (Redoxzentrum: FMN); OFOR, 2-Oxoacid:Ferredoxin Oxidoreduktase (Redoxzentren: Thiaminpyrophosphat, [4Fe-4S]-Cluster); PFOR, Phthalat Dioxygenase Reduktase (Redoxzentren: FMN, [2Fe-2S]-Cluster).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bis auf die Angehörigen der Klasse IV, deren Vorkommen bislang nur bei thermophilen Bakterien beschrieben wurde, alle hier gezeigten Cytochrom P450 Typen auf Elektronentransportsysteme angewiesen sind, die als Redoxzentren entweder nur Flavine (FAD, FMN, Klasse II, Klasse III, Klasse VI, Klasse VIII) oder aber ein Flavin und einen oder zwei Eisen-Schwefel-Cluster aufweisen (Klasse I, Klasse V, Klasse VII). Entsprechend gehören die einzelnen Proteinkomponenten entweder den Eisen-Schwefel-Proteinen oder den Flavoproteinen an. Auf diese beiden großen Proteingruppen soll im Folgenden näher eingegangen werden.

## 1.2. Eisen-Schwefel-Proteine und Ferredoxine

Eisen-Schwefel-Proteine stellen eine Gruppe ubiquitär vorkommender, evolutionär sehr alter Proteine dar, die durch das Vorhandensein von wenigstens einem Nicht-Häm Eisen, das durch anorganischen Schwefel und/oder Cystein oder Histidin koordiniert ist, charakterisiert sind. Durch ihre Fähigkeit, die Elektronendichte über die Eisen- und die Schwefelatome zu delokalisieren, eignen sich [Fe-S]-Cluster hervorragend als prosthetische Gruppen von Elektronentransportproteinen. Entsprechend sind Eisen-Schwefel-Proteine bei einer Vielzahl grundlegender biologischer Reaktionen involviert (Sticht und Rosch, 1998; Schmidt und Shaw, 2001; Johnson *et al.*, 2005; Brzoska *et al.*, 2006).

Nach der Art, Anzahl und Koordination des [Fe-S]-Clusters können verschiedene Klassen von Eisen-Schwefel-Proteinen unterschieden werden. Abgesehen von den komplexen Eisen-Schwefel-Proteinen, die sich durch das Vorhandensein weiterer prosthetischer Gruppen (wie Häm oder FAD) oder zusätzlicher Metallionen auszeichnen, unterteilt man die Eisen-Schwefel-Proteine in vier Klassen (siehe Abbildung 1.2.1): Rubredoxine, Ferredoxine, Rieske-Proteine und HiPIPs (High Potential Iron Proteins). Rubredoxine als die einfachsten Eisen-Schwefel-Proteine enthalten nur ein Eisenatom, das durch vier Cysteinreste koordiniert wird. Rieske Proteine enthalten einen [2Fe-2S]-Cluster, bei dem je ein Eisen durch zwei Cysteinreste und ein Eisen durch zwei Histidinreste koordiniert wird. Bei den HiPIPs wird ein [4Fe-4S]-Cluster durch vier Cysteinreste koordiniert; wie ihr Name impliziert, weisen diese Eisen-Schwefel-Proteine ein positives Redoxpotential auf. Ferredoxine hingegen sind durch ein negatives Redoxpotential charakterisiert und können verschiedene [Fe-S]-Cluster (siehe Abbildung 1.2.2) enthalten, die jedoch immer von vier Cysteinresten koordiniert werden (Lovenberg, 1973; Sticht und Rosch, 1998; Bian und Cowan, 1999). Nach der Anzahl der [Fe-S]-Cluster kann man Ferredoxine dem Monocluster- oder dem Dicluster-Typ zuordnen (Beinert, 1990). [2Fe-2S]-Cluster kommen dabei nur beim Monocluster-Typ vor; Ferredoxine mit einem [2Fe-2S]-Cluster können anhand von Unterschieden in der Sequenz, dem Redoxpotential und ESR-Spektren einer von drei Untergruppen zugerechnet werden: den Pflanzen-Typ Ferredoxinen aus höheren Pflanzen und Blaualgen, den Vertebraten-Typ Ferredoxinen aus Wirbeltieren und einigen Bakterien sowie den Thioredoxin-Typ Ferredoxinen aus Bakterien (Holden *et al.*, 1994; Meyer, 2001). Das Vorkommen von Ferredoxinen, die [3Fe-4S]-Cluster und/oder [4Fe-4S]-Cluster enthalten, ist normalerweise auf Bakterien beschränkt.

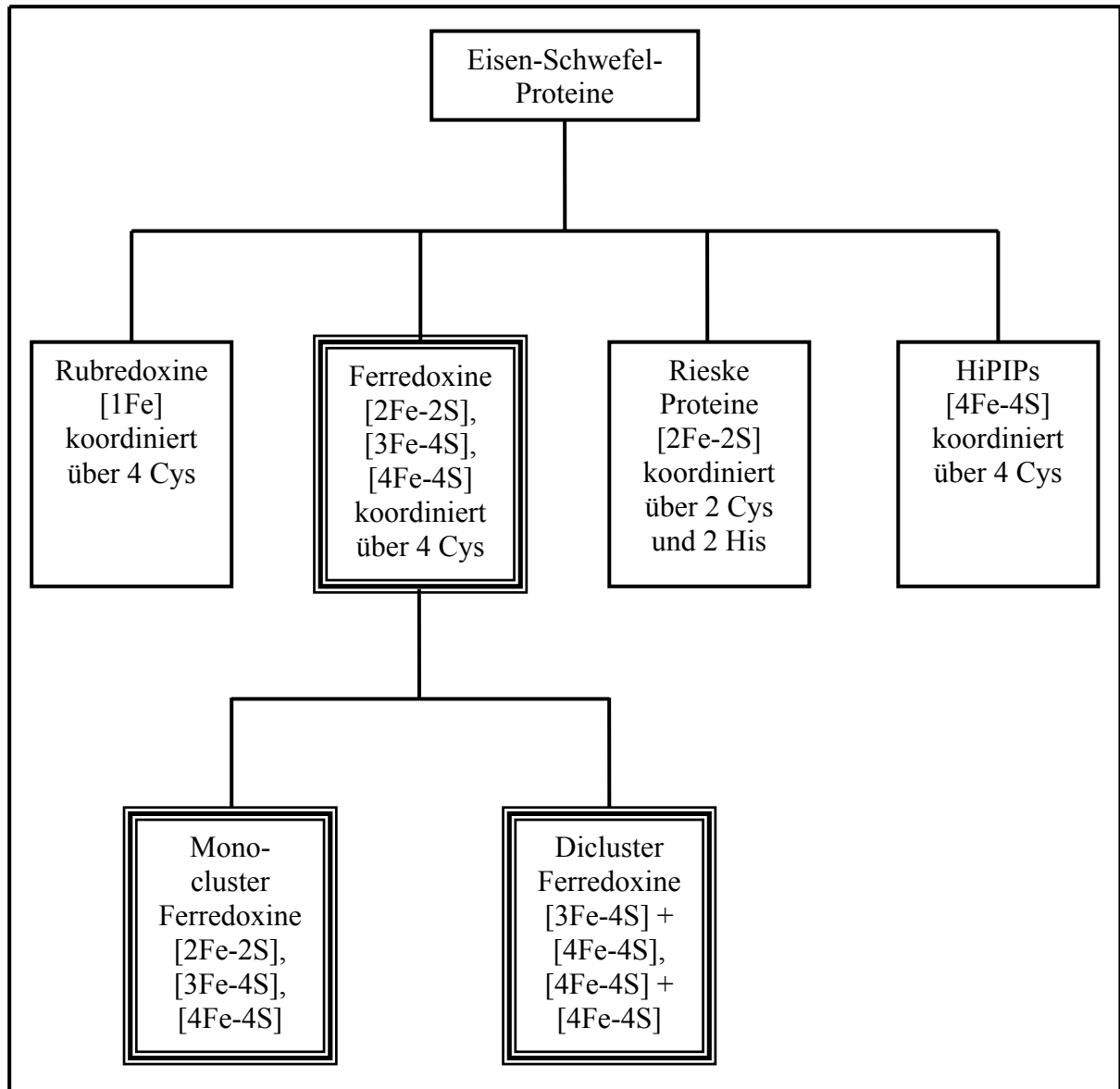


Abbildung 1.2.1: Einteilung der einfachen Eisen-Schwefel-Proteine und speziell der Ferredoxine (modifiziert nach (Beinert, 1990; Sticht und Rosch, 1998; Bian und Cowan, 1999))

Ferredoxine sind als lösliche, saure Proteine niederen Molekulargewichtes (normalerweise 6-24 kD) (Lovenberg, 1973) mit ihrer Funktion als Elektronenüberträger in allen biologischen Reichen bei oft sehr unterschiedlichen Reaktionen anzutreffen. So sind unterschiedliche Arten von [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen beispielsweise an der Biogenese von Eisen-Schwefel-Zentren, der Stickstofffixierung oder der Photosynthese beteiligt (Meyer, 2008). Von [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen aus Halobakterien weiß man, dass sie nicht nur bei der Reduzierung von Nitrit, sondern auch bei der Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketosäuren eine Rolle spielen. Aber auch Ferredoxine, die [4Fe-4S] und/oder [3Fe-4S]-Cluster enthalten, dienen als Elektronentransportproteine und sind häufig in Organismen zu finden, die Wasserstoff metabolisieren oder produzieren. Beispielsweise können Ferredoxine dieses Typs Elektronen von der Pyruvat Oxidoreduktase aufnehmen und auf die Hydrogenase übertragen (Meyer, 2000). Daneben wurde auch hier eine Beteiligung an der Fixierung von Stickstoff vorgeschlagen. Insgesamt verfügen die bakteriellen Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine bezüglich ihres Aufgabenfeldes über ein noch breiteres Spektrum als die [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine, obwohl ihr Vorkommen größtenteils auf anaerobe Stoffwechselwege beschränkt ist. Dicluster-Typ Ferredoxine mit zwei [4Fe-4S]-Clustern bzw. einem [3Fe-4S] und einem [4Fe-4S]-Cluster haben ähnliche Funktionen wie die Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine mit nur einem Cluster (Sticht und Rosch, 1998; Meyer, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit ist allerdings eine andere, sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten weit verbreitete Rolle der Ferredoxine von Interesse: ihre Funktion als Elektronenmediatoren in Cytochrom P450 Systemen. Die wohl am besten untersuchten Beispiele hierfür sind die beiden [2Fe-2S]-Cluster Vertebraten-Typ Ferredoxine Adrenodoxin (Adx) aus Säugern und Putidaredoxin (Pdx) aus *Pseudomonas putida* (siehe die Übersichtsarbeit von Schiffler und Bernhardt, (Schiffler und Bernhardt, 2003)). Adx dient als Elektronenüberträger in mitochondrialen Klasse I Cytochrom P450 Systemen zwischen der Adrenodoxin Reduktase (AdR) und den mitochondrialen Cytochrom P450 Enzymen CYP11A1 (P450<sub>scc</sub>), CYP11B1 (11 $\beta$ -Hydroxylase) und CYP11B2 (Aldosteron Synthase), die essentiell für die Steroidhormon-Biosynthese sind (Bernhardt und Waterman, 2007). Pdx hingegen ist das Ferredoxin des ersten beschriebenen bakteriellen Klasse I Cytochrom P450 Systems und überträgt als solches Elektronen von der Putidaredoxin Reduktase (PdR) auf CYP101 (P450<sub>cam</sub>), das Kampher hydroxyliert und damit als Kohlenstoffquelle verwertbar macht.

Interessanterweise kennt man neben [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen aber auch Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine sowohl des Monocluster als auch des Dicluster-Typs, die Elektronen

an verschiedene Cytochrom P450 Enzyme liefern (McLean *et al.*, 2005). So kann beispielsweise CYP105D1 (P450soy) aus *Streptomyces griseus* sowohl von einem [3Fe-4S]-Cluster Ferredoxin als auch von einem 7 Fe Ferredoxin, das einen [3Fe-4S]-Cluster und einen [4Fe-4S]-Cluster aufweist, Elektronen aufnehmen (Trower *et al.*, 1990a; Ramachandra *et al.*, 1991; Trower *et al.*, 1992). Auch in verschiedenen Mycobakterien Spezies ist es nicht ungewöhnlich, dass Cytochrom P450 Systeme [3Fe-4S]-Cluster Ferredoxine beinhalten (Bellamine *et al.*, 1999; Sielaff *et al.*, 2001; Sielaff und Andreesen, 2005b). In *Bacillus subtilis* wurde ein [4Fe-4S]-Cluster Ferredoxin als möglicher Elektronenüberträger zu CYP107H (P450BioI) vorgeschlagen (Green *et al.*, 2003). Derartige auf Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen basierende Cytochrom P450 Systeme wurden bislang allerdings ausschließlich bei Bakterien beschrieben (Hannemann *et al.*, 2007).

Die in Cytochrom P450 Systeme involvierten Ferredoxine treten normalerweise als separate Komponenten der Klassen I und IV auf. Dennoch soll der Vollständigkeit halber darauf hingewiesen werden, dass auch ein bakterielles Fusionsprotein (CYP51, EC 1.14.13.70 aus *Methylococcus capsulatus*) bekannt ist, das aus einer Cytochrom P450 Domäne und einer [3Fe-4S]-Cluster Ferredoxin Domäne besteht. Dieses Fusionsprotein wurde als bislang einziges Mitglied der Klasse V der Cytochrom P450 Systeme zugeordnet (Jackson *et al.*, 2002; Hannemann *et al.*, 2007).

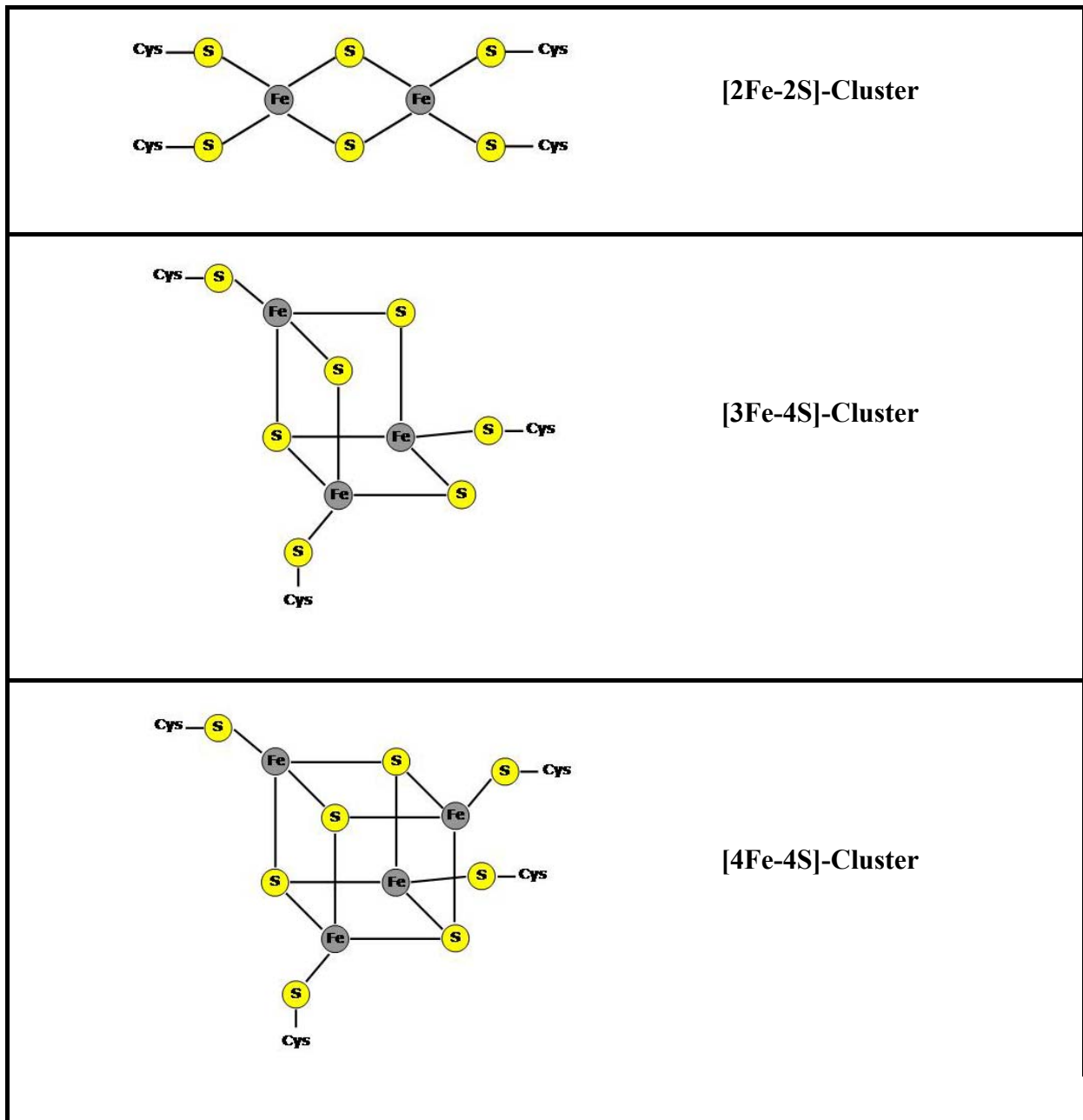


Abbildung 1.2.2: Schematische Darstellung verschiedener, in Ferredoxinen vorkommender [Fe-S]-Cluster (modifiziert nach (Beinert, 1990))

Bei dem ubiquitären Auftreten der Ferredoxine und der großen Diversität ihrer Aufgaben ist eine eingehende Charakterisierung und die Zuordnung zu einem Cluster-Typ ein wichtiger Schritt, um Hinweise auf die mögliche Funktion eines Ferredoxins zu erhalten. Wichtige Charakterisierungsmerkmale bieten dabei die durch den Eisen-Schwefel-Cluster bedingten spektralen Eigenschaften des jeweiligen Proteins. Bereits mit bloßem Auge ist zu erkennen, dass [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine eine rötlich-braune Färbung aufweisen, während Ferredoxine mit mehr als zwei Eisenatomen pro Proteinmolekül eine dunkelbraune Färbung zeigen (Lovenberg, 1973). Dementsprechend unterscheiden sich auch die UV/Vis-Spektren der [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine und der Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine deutlich voneinander. Neben dem Proteinpeak bei 276 nm besitzen [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine normalerweise ein Maximum im nahen UV-Bereich (bei etwa 330 nm) sowie zwei Maxima im sichtbaren Bereich (bei etwa 460 nm und 420 nm), die auf den Eisen-Schwefel-Cluster zurückzuführen sind. Die Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine hingegen zeigen ein vergleichsweise wenig strukturiertes UV/Vis-Spektrum, in dem neben dem Proteinpeak nur ein durch den Eisen-Schwefel-Cluster hervorgerufenes relativ breites Maximum zwischen 380 nm und 400 nm vorhanden ist. Eine Unterscheidung zwischen [3Fe-4S]-Cluster, [4Fe-4S]-Cluster oder Dicluster Ferredoxinen ist anhand des UV/Vis-Spektrums nicht möglich (Sticht und Rosch, 1998).

Neben der UV/Vis-Spektroskopie bietet auch die CD-Spektroskopie die Möglichkeit, [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine und Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine zu unterscheiden. So zeigen selbst [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine mit unterschiedlichen physiologischen Funktionen, wie das in die Photosynthese eingebundene Spinat Ferredoxin und das Cytochrom P450 assoziierte Adrenodoxin, ähnliche CD-Spektren im sichtbaren Bereich, während eine derartige Übereinstimmung der Spektren bei Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen nicht auftritt (Lovenberg, 1973; Stephens *et al.*, 1978). Die Tatsache, dass die CD-Spektren der Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine im Gegensatz zu ihren UV/Vis-Spektren stark strukturiert und sehr unterschiedlich sind, kann genutzt werden, um die einzelnen Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine zu charakterisieren und zu unterscheiden.

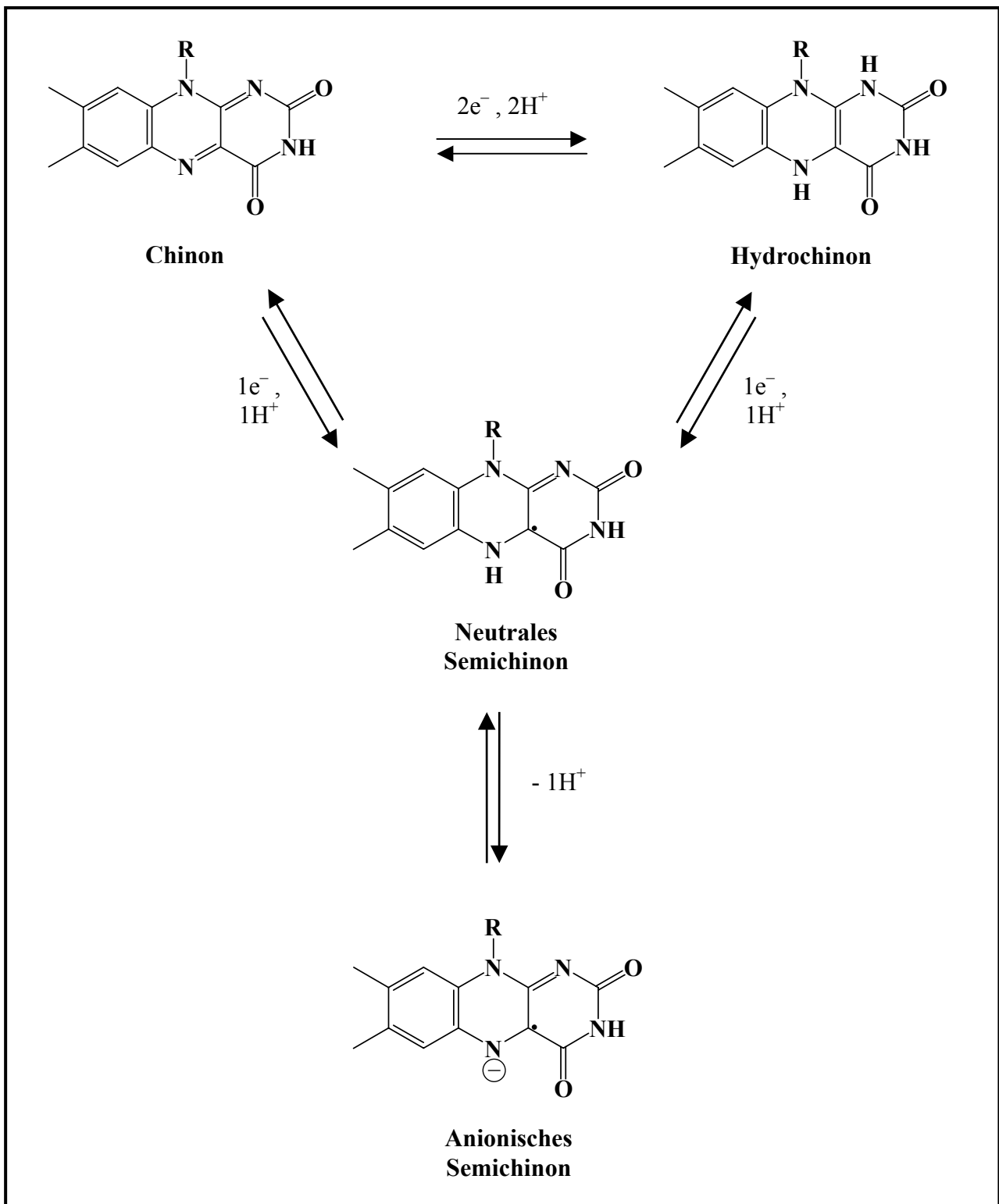
Eine weiterführende Charakterisierung sowohl der [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine als auch der Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine ist mittels ESR-Spektroskopie möglich. Die [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine zeigen nur im reduzierten  $[2Fe-2S]^{1+}$  Zustand ein ESR-Signal, nicht aber im diamagnetischen oxidierten  $[2Fe-2S]^{2+}$  Grundzustand. Sie können in axiale und rhombische Cluster-Typen unterteilt werden, wobei diese Unterteilung oft schon Rückschlüsse auf die Funktion zulässt, da beispielsweise [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine aus



Cytochrom P450 Systemen dem axialen Typ angehören, während die in die Photosynthese involvierten Pflanzen-Typ Ferredoxine rhombische ESR-Spektren aufweisen (Palmer *et al.*, 1967; Lovenberg, 1973; Cammack *et al.*, 1999). Aber auch für die Charakterisierung der Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine ist die ESR-Spektroskopie aufschlussreich, da sich [3Fe-4S]-Cluster und [4Fe-4S]-Cluster unterschiedlich verhalten. [3Fe-4S]-Cluster sind im [3Fe-4S]<sup>1+</sup> Zustand paramagnetisch und zeigen somit im oxidierten Zustand ein ESR-Signal, während der reduzierte [3Fe-4S]<sup>0</sup> Zustand diamagnetisch und damit ESR-still ist. [4Fe-4S]-Cluster Ferredoxine hingegen sind im oxidierten [4Fe-4S]<sup>2+</sup> Zustand diamagnetisch und können nur nach Reduktion des Clusters zur [4Fe-4S]<sup>1+</sup> Form in der ESR-Spektroskopie detektiert werden (Lovenberg, 1973; Guigliarelli und Bertrand, 1999; Sykes und Cammack, 1999). Damit kann die ESR-Spektroskopie verwendet werden, um zu bestimmen, ob ein Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxin einen [3Fe-4S]-Cluster, einen [4Fe-4S]-Cluster oder aber zwei unterschiedliche Cluster enthält.

### 1.3. Flavoproteine

Flavoproteine sind ubiquitär vorkommende Proteine, die in diverse biologische Prozesse eingebunden sind und sich durch das Vorhandensein von einem von Riboflavin (Vitamin B<sub>1</sub>) abgeleiteten Flavin als prosthetische Gruppe auszeichnen. Aufgrund der biochemischen Eigenschaften des redox-aktiven Teils der Flavine, des Isoalloxazinrings, sind Flavoproteine in der Lage, sowohl Ein- als auch Zwei-Elektronenübertragungen durchzuführen. Denn Flavine können in drei Redoxzuständen vorliegen (Abbildung 1.3): in oxidiertem Form als Chinon, nach Aufnahme eines Elektrons als Semichinonradikal oder in vollständig reduzierter Form als Hydrochinon (Chapman und Reid, 1999; Fraaije und Mattevi, 2000). Die Mehrzahl der Flavoproteine enthält als prosthetische Gruppe ein nicht-kovalent gebundenes Flavinmononukleotid (FMN) oder Flavinadeninukleotid (FAD); allerdings sind auch Beispiele bekannt, bei denen das Flavin kovalent über die 8 $\alpha$ -Methylgruppe oder das C6-Atom des Isoalloxazinrings mit dem Protein verknüpft ist. Außerdem gibt es auch eine ganze Reihe von Flavoproteinen, die mehrere prosthetische Gruppen enthalten, wie beispielsweise die Cytochrom P450 Reduktase mit den zwei Redoxzentren FAD und FMN oder die komplexen Flavoproteine, die zusätzlich zu einem Flavin noch andere prosthetische Gruppen wie beispielsweise Häm oder [Fe-S]-Cluster aufweisen (Chapman und Reid, 1999). Nach Massey (Massey, 1994; Massey, 1995) kann man die Flavoproteine anhand der Geschwindigkeit ihrer Reaktion mit Sauerstoff und den dabei auftretenden Produkten vier verschiedenen Gruppen zuordnen: den Oxidasen wie z.B. die Glucose Oxidase in Pflanzen und Mikroorganismen oder das komplexe Metalloflavoprotein Xanthin Oxidase, das beim aeroben Purinabbau beteiligt ist, den Monooxygenasen wie z. B. die Phenol Hydroxylase, den Dehydrogenasen wie z.B. die am Citratzyklus beteiligte Succinat Dehydrogenase oder den Elektronentransferasen wie z.B. die Ferredoxin-NADP(H) Reduktase oder Flavodoxin. Mit Hinblick auf ihre Bedeutung in Cytochrom P450 Systemen sollen hier die Elektronentransferasen näher betrachtet werden, speziell die Ferredoxin Reduktase (FdR), die Cytochrom P450 Reduktase (CPR), die Phthalat Dioxygenase Reduktase (PFOR) sowie Flavodoxin.



**Abbildung 1.3: Struktur und Redoxübergänge der Flavine (modifiziert nach (Chapman und Reid, 1999))**

Der Isoalloxazinring des Flavins kann sowohl Ein- als auch Zwei-Elektronenübergänge durchführen; deswegen kann ein Flavin in drei verschiedenen Redoxzuständen vorliegen: als Chinon (oxidiert), als Semichinon (reduziert, 1 Elektron) oder als Hydrochinon (reduziert, 2 Elektronen).

Ferredoxin Reduktasen sind Flavoenzyme, die aus einer Flavin-Bindedomäne und einer NAD(P)-Bindedomäne aufgebaut sind. Als prosthetische Gruppe enthalten sie ein nicht-kovalent gebundenes FAD, das für den Transport von Reduktionsäquivalenten zwischen NAD(P)H und Ferredoxin verwendet wird. Ferredoxin Reduktasen übernehmen damit die wichtige Aufgabe, zwischen dem Zwei-Elektronenüberträger NAD(P)H und dem Ein-Elektronenüberträger Fdx zu vermitteln.



Obwohl alle Ferredoxin Reduktasen diese Reaktion katalysieren, unterscheidet man zwei strukturell unterschiedliche und phylogenetisch nicht verwandte Familien (Dym und Eisenberg, 2001; Aliverti *et al.*, 2008): die Glutathion Reduktase Familie und die eigentliche Ferredoxin-NADP<sup>+</sup> Reduktase oder auch Pflanzen-Typ Familie. Die Ferredoxin Reduktasen, die in Klasse I Cytochrom P450 Systemen Reduktionsäquivalente vom primären Elektronendonator NAD(P)H auf ein Ferredoxin übertragen, werden der Glutathion Reduktase Familie zugeordnet. Beispiele hierfür sind die mitochondriale NADPH-abhängige Adrenodoxin Reduktase (AdR) oder die bakterielle NADH-abhängige Putidaredoxin Reduktase (Hannemann *et al.*, 2007), auf deren Rolle in den entsprechenden Cytochrom P450 Systemen bereits zuvor eingegangen wurde.

Der zweiten Familie gehören – wie schon die Bezeichnung „Pflanzen-Typ“ Ferredoxin Reduktase andeutet – unter anderem die pflanzliche Ferredoxin Reduktase an, die in der Photosynthese Reduktionsäquivalente von dem durch das Photosystem I reduzierten Ferredoxin auf NADP<sup>+</sup> überträgt. Allerdings sind Flavoenzyme dieses Typs nicht nur auf die Photosynthese beschränkt. In Cyanobakterien konnte z.B. gezeigt werden, dass das entsprechende Enzym in photosynthetisch aktiven Zellen als NADP<sup>+</sup> Reduktase, in Heterozysten aber in umgekehrter Richtung als Ferredoxin Reduktase wirkt (Razquin *et al.*, 1996; Carrillo und Ceccarelli, 2003).

Die Ferredoxin Reduktasen des Pflanzen-Typs werden mit weiteren Flavoproteinen, die den pflanzlichen Ferredoxin Reduktasen im Aufbau ähneln, aber noch über zusätzliche Domänen verfügen, zu einer Superfamilie zusammengefasst. Zu dieser Superfamilie gehören unter anderem auch die Cytochrom P450 Reduktase (CPR) und die Phthalat Dioxygenase Reduktase (PFOR) (Aliverti *et al.*, 2008).

Die Cytochrom P450 Reduktase gehört zu den Diflavin Reduktasen und besitzt als solche neben einem nicht-kovalent gebundenen FAD auch ein nicht-kovalent gebundenes FMN als prosthetische Gruppe. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, schrittweise zwei Elektronen von NADPH über ihre prosthetische Gruppen FAD und FMN auf Klasse II Cytochrom P450 Enzyme zu übertragen (Porter und Larson, 1991; Murataliev *et al.*, 2004), die hauptsächlich in eukaryotischen Organismen vorkommen und dort unterschiedlichste Aufgaben übernehmen wie beispielsweise den Abbau von Xenobiotika wie Arzneistoffen in Säugern, die Biosynthese von Cutin, Lignin oder Antifraßstoffen in Pflanzen oder die Biosynthese von Membransterolen oder Mycotoxinen in Pilzen (Hannemann *et al.*, 2007). Gemäß ihrer Funktion in mikrosomalen Cytochrom P450 Systemen ist das Vorkommen der CPR fast ausschließlich auf Eukaryoten beschränkt. Bislang wurde nur ein einziges prokaryotisches Klasse II Cytochrom P450 System in *Streptomyces carbophilus* beschrieben, das aus dem Mevastatin hydroxylierendem CYP105A3 und einer CPR besteht (Serizawa und Matsuoka, 1991). Interessanterweise sind in diesem bakteriellen System beide Komponenten löslich, während bei den eukaryotischen Systemen sowohl CYP als auch CPR mit Membranankern ausgestattet sind (Hannemann *et al.*, 2007) (Abbildung 1.1C).

In ihrem Aufbau zeigt die CPR in ihrem N-terminalen Bereich Homologien zu dem FMN-enthaltenden Flavoprotein Flavodoxin, während ihr C-terminaler Bereich eine Ferredoxin Reduktase Struktur mit FAD- und NADP-Bindedomäne aufweist. Daher nimmt man an, dass die CPR aus der Fusion eines Flavodoxin Gens mit einem Ferredoxin Reduktase Gen hervorgegangen ist (Murataliev *et al.*, 2004; Hannemann *et al.*, 2007). Die CPR wurde aber auch selbst als Teil komplexer Enzyme mit zusätzlichen Domänen gefunden. Ein Beispiel dafür sind die Flavocytochrome P450, die als eigenständige Klasse VIII der Cytochrom P450 Systeme angesehen werden und bei verschiedenen Prokaryoten sowie niederen Eukaryoten beschrieben wurden (Murataliev *et al.*, 2004; Hannemann *et al.*, 2007). Ein prominentes Beispiel für ein solches Flavocytochrom ist die Fettsäurehydroxylase CYP102A1 (P450BM3, EC 1.14.14.1) aus *Bacillus megaterium*, die die bislang höchste bekannte Monooxygenase Aktivität eines Cytochrom P450 Systems aufweist.

Bei der Phthalat Dioxygenase Reduktase (PFOR) handelt es sich um ein Eisen-Schwefel Flavoprotein, das neben einem nicht-kovalent gebundenen FMN noch über einen Pflanzen-Typ [2Fe-2S]-Cluster als prosthetische Gruppe verfügt (Batie *et al.*, 1987; Gassner *et al.*, 1995). Die PFOR selbst ist normalerweise nicht an Cytochrom P450 abhängige Reaktionen beteiligt. Jedoch sind mehrere bakterielle Cytochrome P450 bekannt, bei denen das

eigentliche Cytochrom P450 Enzym C-terminal mit einer PFOR-artigen Domäne fusioniert ist (De Mot und Parret, 2002; Roberts *et al.*, 2002). Die Klasse VII (Hannemann *et al.*, 2007) Cytochrom P450 Enzyme können also auch als komplexe Flavoenzyme beschrieben werden, die als Redoxzentren ein FMN, einen [2Fe-2S]-Cluster sowie ein Häm aufweisen. Der erste beschriebene Vertreter dieser Klasse ist CYP116B2 (P450RhF) aus *Rhodococcus* (Roberts *et al.*, 2002); interessanterweise zeigte sich bei der näheren Untersuchung dieses Enzyms, dass es im Gegensatz zur NADH-abhängigen PFOR als primären Elektronendonator NADPH bevorzugt (Roberts *et al.*, 2003; Hunter *et al.*, 2005).

Flavodoxine sind kleine (15-23 kD) saure Flavoproteine, die ein nicht-kovalent gebundenes FMN als prosthetische Gruppe enthalten und zu den Elektronentransferasen gehören. Sie kommen in Bakterien und Algen, nicht jedoch in höheren Pflanzen oder Tieren vor (Porter und Larson, 1991). Es ist bekannt, dass Flavodoxine die Funktion von Ferredoxinen übernehmen können; in *Anabaena* beispielsweise kann Flavodoxin bei Eisenmangel das [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxin in der Photosynthese ersetzen und Reduktionsäquivalente auf die Ferredoxin Reduktase übertragen (Fillat *et al.*, 1991). Ähnliches wurde auch bei Cytochrom P450 Systemen beobachtet: Flavodoxine sind in einigen Fällen in der Lage, die Ferredoxine der Klasse I Cytochrom P450 Systeme zu ersetzen und bei heterologer Expression der Cytochrom P450 Enzyme deren Aktivität *in vivo* oder auch *in vitro* zu gewährleisten (Jenkins und Waterman, 1994; Jenkins *et al.*, 1997; Bellamine *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurden auch Cytochrom P450 Systeme (Klasse III) postuliert, in denen ein Flavodoxin der natürliche Redoxpartner des Cytochrom P450 Enzyms ist (Hawkes *et al.*, 2002; Lawson *et al.*, 2004; Kimmich *et al.*, 2007). In dieser Klasse der Cytochrom P450 Systeme werden die beiden für die Reaktion benötigten Elektronen also vom primären Elektronendonator über das FAD der Ferredoxin/Flavodoxin Reduktase zum FMN des Flavodoxins und schließlich zur Häm-Gruppe des Cytochrom P450 Enzyms geleitet. Betrachtet man die an der Reaktion beteiligten Redoxzentren, so ähnelt der Aufbau der Klasse III Cytochrom P450 Systeme dem der Klassen II und VIII, wobei allerdings zu beachten ist, dass die drei Redoxzentren FAD, FMN und Häm in Klasse III auf drei Proteine verteilt sind.

Ähnlich wie im Fall der CPR, die entweder als separates Protein (Klasse II) oder aber als Teil eines Flavocytochromes P450 (Klasse VIII) in Cytochrom P450 Systemen auftritt, wurde auch über Flavodoxin als Teil eines natürlichen Cytochrom P450 Fusionsproteins (Klasse VI) berichtet (Rylott *et al.*, 2006; Hannemann *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2007).

## 1.4. Myxobakterien

Myxobakterien sind Gram-negative Bodenbakterien, die sich durch ihre unter den Prokaryoten einzigartige Fähigkeit zur Bildung multizellulärer, artspezifischer Fruchtkörper bei Nahrungsmangel, durch ihre gleitende Fortbewegung sowie durch den hohen GC-Gehalt ihrer DNA (67-70%) auszeichnen (Dawid, 2000). Sie gehören zur  $\delta$ -Gruppe der Proteobakterien und werden in der Ordnung *Myxococcales* zusammengefasst, die wiederum die drei Unterordnungen *Cystobacterineae*, *Sorangiiineae* und *Nannocystineae* umfasst (Weissman und Müller, 2009).

Myxobakterien, insbesondere Angehörige des Genus *Sorangium*, sind als Produzenten biologisch aktiver Sekundärmetabolite bekannt. Derartige Naturstoffe sind von immenser Bedeutung, da sie selbst oder aber von ihnen abgeleitete Strukturen oftmals zur Entwicklung neuartiger Arzneistoffe herangezogen werden können. Insbesondere bei der Bekämpfung von Krebs sowie von bakteriellen Infektionskrankheiten dienen überwiegend Naturstoffe als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Therapeutika (Newman und Cragg, 2007). Mikroorganismen sind für die industrielle Produktion von Naturstoffen besonders geeignet, da sie im Bioreaktor kultiviert werden können und oft auch Methoden zur genetischen Modifikation etabliert sind, um eine größere Variabilität oder aber gegebenenfalls eine gezielte Änderung der Grundstruktur zu erreichen. Unter den Bakterien sind neben den Actinomyceten, den Bacillen und den Pseudomonaden besonders die Myxobakterien als Produzenten von für die Pharmaindustrie interessanten Sekundärmetaboliten hervorzuheben (Reichenbach, 2001; Weissman und Müller, 2009). Bislang wurden über 100 neue biologisch aktive Naturstoff-Grundstrukturen sowie ca. 500 Derivate aus Myxobakterien isoliert (Bode und Müller, 2006). Interessanterweise zeigen viele dieser myxobakteriellen Sekundärmetabolite bislang noch nicht beschriebene Wirkungsmechanismen oder wirken auf Strukturen, die von anderen Sekundärstoffproduzenten offenbar kaum als Angriffspunkt genutzt werden (Reichenbach, 2001; Wenzel und Müller, 2009a; Wenzel und Müller, 2009b). Etwa die Hälfte der Naturstoffe aus Myxobakterien wurde aus *Sorangium cellulosum* Stämmen isoliert (Gerth *et al.*, 2003; Rachid *et al.*, 2007), darunter auch die bislang vielversprechendsten myxobakteriellen Sekundärmetabolite, die Epothilone (Reichenbach, 2001; Altmann *et al.*, 2008). Epothilone bilden eine neue Klasse von Krebstherapeutika, deren Wirkungsweise ähnlich der des aus der Eibe (*Taxus*) gewonnenen Taxols ist. Durch Stabilisierung der Mikrotubuli stören die Epothilone die Bildung und Funktion der

Mitosespindel. Hierdurch kommt es zu einem Arrest in der G<sub>2</sub>-M Phase und in der Folge zur Apoptose-Induktion. Gegenüber Taxol haben Epothilone den Vorteil, dass sie besser wasserlöslich sind, wodurch eine parenterale Applikation ohne Verwendung von Lösungsmitteln möglich ist. Zur Zeit werden sieben Epothilone bzw. Epothilon-Derivate in klinischen Studien getestet (Altmann und Gertsch, 2007); eine dieser Substanzen (Ixabepilone) wurde bereits in den USA von der FDA (Food and Drug Administration) zur Behandlung von Brustkrebs zugelassen (Vahdat, 2008).

Da unter den Vertretern des Genus *Sorangium* viele Produzenten von potentiell pharmazeutisch relevanten Sekundärmetaboliten gefunden wurden, wurde ein *Sorangium cellulosum* Stamm (So ce56) als Modellstamm für ein funktionales Genomprojekt durch ein deutsches Konsortium ausgewählt (Bielefeld GenMik Netzwerk des BMBF; <http://genetik.uni-bielfeld.de/GenoMik/cluster6.html>). Der ausgesuchte Stamm zeichnet sich durch sein homogenes Wachstum in Flüssigkulturen sowie die für Myxobakterien relativ geringen Generationszeit von 7 Stunden aus (Gerth *et al.*, 2003; Perlova *et al.*, 2006). Außerdem sind bereits drei biologisch aktive Substanzen (das fungizid wirkende Chivosazol, das Makrolid-Antibiotikum Etnangien sowie der Eisen-Chelator Myxochelin) in dem Stamm identifiziert worden (Gaitatzis *et al.*, 2005; Bode und Müller, 2006; Schneiker *et al.*, 2007). Die genomische Sequenz des obligat aeroben Bakteriums *Sorangium cellulosum* So ce56, die mit einer Größe von über 13 Mbp das bislang größte bekannte bakterielle Genom darstellt, wurde Ende 2007 publiziert (Schneiker *et al.*, 2007). Das Genom von *Sorangium cellulosum* So ce56 enthält insgesamt 17 Loci, die mit der Produktion von Sekundärmetaboliten assoziiert sind, so dass neben den drei bekannten Substanzen mit der Entdeckung weiterer Naturstoffe gerechnet werden kann.

Unter den 9367 kodierenden Sequenzen des Genoms (Schneiker *et al.*, 2007) befinden sich auch 21 Cytochrom P450 Gene (Khatri, 2009). Diese Zahl ist sogar noch etwas größer als die anderer wichtiger Sekundärmetabolitproduzenten wie *Streptomyces coelicolor* A3 (18 CYPs) oder *Streptomyces peucetius* ATCC 27952 (15 CYPs) (Lamb *et al.*, 2002; Parajuli *et al.*, 2004). Auch wenn die physiologische Rolle der *Sorangium cellulosum* So ce56 Cytochrome P450 bislang nicht bekannt ist, kann spekuliert werden, dass zumindest einige dieser Enzyme an der Bildung pharmazeutisch interessanter Sekundärmetabolite beteiligt sein könnten, wie dies aus anderen Organismen bekannt ist (Guengerich, 2002). Ebenso wie die *in vivo* Funktion der *Sorangium cellulosum* So ce56 Cytochrome P450 ist auch die Natur ihrer Elektronentransportkette ungeklärt. Bislang wurden weder für eines dieser 21 Cytochrome P450 noch für eines der anderen beschriebenen myxobakteriellen Cytochrome P450 endogene



Redoxpartner identifiziert. Selbst für das wohl am besten charakterisierte myxobakterielle Cytochrom P450 CYP167A1 (P450epoK), das die Epoxidation der Epothilone C und D zu A und B katalysiert, ist die endogene Elektronentransferkette nicht bekannt (Nagano *et al.*, 2003; Ogura *et al.*, 2004).

## 1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Myxobakterien sind als Produzenten biologisch aktiver Sekundärmetabolite seit einigen Jahren in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt, da Naturstoffe bakteriellen oder auch pflanzlichen Ursprungs oft als Leitstrukturen zur Entwicklung neuartiger Arzneistoffe (insbesondere Zytostatika und Antibiotika) eingesetzt werden. An der Biosynthese vieler Naturstoffe sind unter anderem auch Mitglieder der Cytochrom P450 Superfamilie beteiligt. Da die meisten Cytochrome P450 nicht direkt mit dem externen Elektronendonator (NADH, NADPH) interagieren können, sind sie von Elektronentransportketten abhängig, bei denen normalerweise zwei Redoxzentren (FAD und FMN oder FAD und ein Eisen-Schwefel-Cluster) auf ein oder zwei zusätzliche Proteine verteilt sind. In den bei Bakterien vorherrschenden Klasse I Cytochrom P450 Systemen wird die Redoxkette von einem Ferredoxin, das mindestens einen Eisen-Schwefel-Cluster enthält, und einer Ferredoxin Reduktase, deren prosthetische Gruppe ein FAD ist, gebildet.

Um das biotechnologische Potential der Myxobakterien besser ausschöpfen zu können, wurden die Genome verschiedener Myxobakterien – u.a. *Sorangium cellulosum* So ce56 - sequenziert (Schneiker *et al.*, 2007). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten im Genom von *S. cellulosum* So ce56 potentielle Cytochrom P450 Interaktionspartner mittels bioinformatischer Methoden identifiziert werden. Die dergestalt ermittelten Kandidatengene sollten anschließend kloniert und in *E. coli* heterolog exprimiert werden. Durch die Überexpression in dem heterologen Wirt sollten ausreichende Proteinmengen hergestellt werden, um eine detaillierte biochemische und biophysikalische Charakterisierung dieser Proteine durchführen zu können. Darüber hinaus sollte in funktionellen Tests mit dem autologen myxobakteriellen CYP260A1 die Fähigkeit der Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen untersucht werden, Elektronentransportketten zu Cytochrom P450 Enzymen zu bilden, um so die einzelnen Komponenten der myxobakteriellen Cytochrom P450 Systeme zu ermitteln. Da aus anderen Organismen bekannt ist, dass oft nur eine einzige Elektronentransportkette für mehrere Cytochrome P450 zur Verfügung steht, wird angenommen, dass eine funktionelle Elektronentransferkette zu CYP260A1 auch für weitere Cytochrome P450 aus *S. cellulosum* So ce56 einsetzbar ist.

Diese Untersuchungen sollten damit die Grundlagen für weitere Analysen des *S. cellulosum* So ce56 CYPoms bieten sowie die Voraussetzungen für die Etablierung eines heterologen Systems für die biotechnologische Produktion von Sekundärmetaboliten schaffen.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

Alle nicht ausdrücklich aufgeführten Chemikalien und Enzyme stammten aus Standardbezugsquellen und waren von analytischem Gütegrad.

#### 2.1.1. Genomische DNA von *Sorangium cellulosum* So ce56

Die für die PCR als Matrize dienende genomische DNA von *Sorangium cellulosum* So ce56 wurde freundlicherweise von Dr. rer. nat. Olena Perlova zu Verfügung gestellt.

#### 2.1.2. Oligonukleotide

Die zur Klonierung der ausgewählten *S. cellulosum* So ce56 Gene verwendeten Primer wurden von den Firmen BioTeZ GmbH (Berlin-Buch, Deutschland) und MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Nukleotidsequenz sowie der Verwendungszweck der einzelnen Oligonukleotide sind dem Anhang (Abschnitt 6.2.) zu entnehmen.

#### 2.1.3. Expressionsplasmide und *E. coli* Stämme

Als *E. coli* Expressionsplasmide wurden pKKHC und pGEX6P1\_nco verwendet. Das Plasmid pKKHC (Porter und Larson, 1991) wurde freundlicherweise von Dr. rer. nat. Todd Porter zur Verfügung gestellt, das Plasmid pGEX6P1\_nco, das durch das Einfügen einer *Nco* I Schnittstelle in die MCS des Vektors pGEX6P1 (Amersham Biosciences) entstand, von Dr. rer. nat. Frank Hannemann. Die Plasmidkarten der verwendeten Expressionsvektoren sind im Anhang (Abschnitt 6.3.) dargestellt.

Zu Klonierungszwecken wurde der *E. coli* Stamm TOP10 verwendet; bei der heterologen Überexpression der myxobakteriellen Proteine kamen die Expressionsstämme BL21 und Rosetta(DE3)pLysS zum Einsatz. Eine Übersicht über die verwendeten Expressionsplasmide und *E. coli* Stämme ist in Tabelle 2.1.1. und Tabelle 2.1.2 zu finden

**Tabelle 2.1.1 Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten *E. coli* Klonierungs- und Expressionsvektoren**

Vektor	Beschreibung	Größe (kb)	Referenz
pCR®4 Blunt- TOPO®	Klonierungsvektor P <sub>lac</sub> , LacZα-ccdB mit TOPO cloning site, Kan <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup> , pUC ori	4,0	Invitrogen Katalog 2005
pKKHC	Expressionsvektor P <sub>TTC</sub> , MCS enthält u.a. <i>Nco</i> I und <i>Hind</i> III Erkennungssequenz, Amp <sup>r</sup> , pBR322 ori	2,8	Porter und Larson, 1991
pGEX6P1_ nco	Expressionsvektor, abgeleitet von pGEX6P1, P <sub>Tac</sub> , GST-Gen, Precision Protease Spaltstelle, modifizierte MCS enthält u.a. <i>Nco</i> I und <i>Eco</i> RI, Amp <sup>r</sup> , pBR322 ori, lacI	4,9	GE Healthcare GST Gene Fusion System Handbook

**Tabelle 2.1.2. Übersicht über die Genotypen der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten *E. coli* Stämme**

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21	F- ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm	Novagen Katalog 2006/2007
Rosetta(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3) pLysSRARE (Cam <sup>R</sup> )	Novagen Katalog 2006/2007
Top10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG	Invitrogen Katalog 2005

#### 2.1.4. Andere verwendete Proteine

Die Reinigung von boviner AdR, bovinem Adx sowie *S. pombe* Etp1<sup>fd</sup> aus rekombinanten *E. coli* Bakterien sowie von bovinem CYP11A1 aus Rindernebennieren erfolgte in der Arbeitsgruppe durch Frau Katharina Bompais und Herrn Wolfgang Reinle wie in der Literatur beschrieben (Omura und Sato, 1964; Sagara *et al.*, 1993; Bureik *et al.*, 2002; Hannemann *et al.*, 2002a). CYP260A1 wurde freundlicherweise von Herrn M. Sc. med. microbiol. Yogan Khatri zur Verfügung gestellt.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Bioinformatische Methoden

Das Genom von *S. cellulosum* So ce56 wurde auf das Vorhandensein möglicher Interaktionspartner von Cytochrom P450 Enzymen untersucht. Hierzu wurde eine Datenbanksuche mit dem Programm „BLAST“ (Basic Local Alignment Search Tool) durchgeführt, bei dem eine Auswahl an Ferredoxinen und verschiedenen Flavoproteinen (siehe Anhang, Abschnitt 6.1.) als Vergleichssequenzen benutzt wurden. Die DNA-Sequenz ausgewählter Hits wurde mit dem „ExpASy Translate tool“ (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>) in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt. Ausgehend von dieser Aminosäuresequenz wurde das theoretische Molekulargewicht und der theoretische isoelektrische Punkt der Proteine mit dem unter [http://us.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html) zu findenden Programm „Compute pI/Mw“ berechnet. Zusätzlich wurde die Domänenstruktur der putativen Eisen-Schwefel Proteine oder Flavoproteine durch einen Abgleich mit der Motiv-Datenbank „Pfam“ (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) untersucht (Finn *et al.*, 2006).

Um die abgeleitete Primärsequenz von *S. cellulosum* So ce56 Fdx1 mit den Sequenzen der [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine Yah1 (Q12184), Etp1<sup>fd</sup> (Q10361) und Adx (P00257) zu vergleichen, wurde das Programm „ClustalW“ (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) verwendet. Das resultierende Alignment wurde mit dem Programm „Boxshade 3.21“ ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)) bearbeitet, so dass identische Aminosäurereste schwarz unterlegt dargestellt werden, während grau unterlegte Bereiche konservierte Reste kenntlich machen.

Um Hinweise auf die Funktion der einzelnen Proteine zu erhalten, wurden die translatierten Nukleotidsequenzen der ausgewählten *S. cellulosum* So ce56 Gene mit den Sequenzen der in Tabelle 2.2.1. aufgeführten Ferredoxine bzw. Flavoproteine aliniert. Hierzu wurde das Programm „Mega4.1“ (Kumar *et al.*, 2004) verwendet, das eine automatische Alinierung mit „Clustal durchführt“. Die errechneten Alignments wurden zur Konstruktion distanzbasierter *Neighbour Joining* Stammbäume verwendet. Zur Überprüfung der statistischen Verlässlichkeit der einzelnen Verzweigungspunkte wurde eine *Bootstrap* Analyse mit 1000 Wiederholungen durchgeführt.

**Tabelle 2.2.1. Für die phylogenetische Analyse eingesetzte Sequenzen von Ferredoxinen bzw. Flavoproteinen**

Proteine, von denen bekannt ist, dass sie *in vivo* oder *in vitro* als Elektronentransporter in Cytochrom P450 Systemen agieren können, sind durch Sternchen markiert.

Abkürzung	Organismus (Referenz)	Beschreibung	UniProt Eintrag
<b>Ferredoxine</b>			
a	<i>Streptomyces coelicolor</i> (Lei <i>et al.</i> , 2004; Chun <i>et al.</i> , 2007)	Ferredoxin [3Fe-4S], [4Fe-4S]	Q9FC76
b	<i>Streptomyces coelicolor</i> (Lei <i>et al.</i> , 2004; Chun <i>et al.</i> , 2007)	Ferredoxin 3Fe-4S], [4Fe-4S]	Q9F335
c	<i>Streptomyces coelicolor</i> (Lei <i>et al.</i> , 2004; Chun <i>et al.</i> , 2007)	Ferredoxin [3Fe-4S], [4Fe-4S]	Q9EWQ1
d*	<i>Streptomyces coelicolor</i> (Lei <i>et al.</i> , 2004; Chun <i>et al.</i> , 2007)	Ferredoxin [3Fe-4S], [4Fe-4S]	Q9EWS5
e	<i>Streptomyces coelicolor</i> (Lei <i>et al.</i> , 2004; Chun <i>et al.</i> , 2007)	Ferredoxin [3Fe-4S], [4Fe-4S]	Q9KXY1
f	<i>Streptomyces coelicolor</i> (Lei <i>et al.</i> , 2004; Chun <i>et al.</i> , 2007)	Ferredoxin [3Fe-4S]	Q7AKQ2
g*	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (McLean <i>et al.</i> , 2006)	Ferredoxin [3Fe-4S]	P71820
k*	<i>Mycobacterium</i> sp. HE5 (Sielaff <i>et al.</i> , 2001)	Ferredoxin [3Fe-4S]	Q5RLM5
h*	<i>Bacillus subtilis</i> (Green <i>et al.</i> , 2003)	Ferredoxin [4Fe-4S]	P50727
i*	<i>Streptomyces griseus</i> (Trower <i>et al.</i> , 1992)	Ferredoxin [3Fe-4S]	P26910
j*	<i>Streptomyces griseus</i> (Trower <i>et al.</i> , 1990b)	Ferredoxin [3Fe-4S], [4Fe-4S]	P13279
1*	<i>Spinacia oleracea</i> (Hannemann <i>et al.</i> , 2007)	Ferredoxin [2Fe-2S]	P00221
2	<i>Petroselinum crispum</i> (Nakano <i>et al.</i> , 1981)	Ferredoxin [2Fe-2S]	Q7M1S1
3*	<i>Zea mays</i> (Lacour und Ohkawa, 1999)	Ferredoxin [2Fe-2S]	O80429
4	<i>Anabaena strain PCC7119</i> (Morales <i>et al.</i> , 2000)	Ferredoxin [2Fe-2S]	P0A3C8
5	<i>Spirulina platensis</i> (Tanaka <i>et al.</i> , 1976)	Ferredoxin [2Fe-2S]	P00246
6*	<i>Pseudomonas putida</i> (Tyson <i>et al.</i> , 1972; Peterson <i>et al.</i> , 1990)	Ferredoxin [2Fe-2S]	P00259
7	<i>Rhodobacter capsulatus</i> (Naud <i>et al.</i> , 1994; Sainz <i>et al.</i> , 2006)	Ferredoxin [2Fe-2S]	P80306
8*	<i>Caulobacter crescentus</i> (Wang <i>et al.</i> , 1995)	Ferredoxin [2Fe-2S]	P37098
9	<i>Mesorhizobium loti</i> (Uchiumi <i>et al.</i> , 2004)	Ferredoxin [2Fe-2S]	Q98M05

10*	<i>Bos taurus</i> (Grinberg <i>et al.</i> , 2000)	Ferredoxin [2Fe-2S]	P00257
11*	<i>Homo sapiens</i> (Grinberg <i>et al.</i> , 2000)	Ferredoxin [2Fe-2S]	P10109
12	<i>Buchnera aphidicola</i> (Shigenobu <i>et al.</i> , 2000)	Ferredoxin [2Fe-2S]	P57661
13	<i>Escherichia coli</i> (Perna <i>et al.</i> , 2001)	Ferredoxin [2Fe-2S]	P0A9R5
14	<i>Azotobacter vinelandii</i> (Zheng <i>et al.</i> , 1998)	Ferredoxin [2Fe-2S]	O69222
15	<i>Pseudomonas aeruginosa PA01</i> (Stover <i>et al.</i> , 2000)	Ferredoxin [2Fe-2S]	Q51383
16	<i>Clostridium pasteurianum</i> (Fujinaga und Meyer, 1993)	Ferredoxin [2Fe-2S]	P07324
17	<i>Azotobacter vinelandii</i> (Chatelet und Meyer, 1999)	Ferredoxin [2Fe-2S]	P82802
18	<i>Myxococcus xanthus</i> (Goldman <i>et al.</i> , 2006)	Putatives Ferredoxin [2Fe-2S]	Q1D2G1
19	<i>Myxococcus xanthus</i> (Goldman <i>et al.</i> , 2006)	Putatives Ferredoxin [2Fe-2S]	Q1D886
<b>Flavoproteine</b>			
1	<i>Burkholderia cepacia</i> (Correll <i>et al.</i> , 1992)	Phthalat Dioxygenase Reduktase	P33164
2	<i>Pseudomonas putida</i> (Nomura <i>et al.</i> , 1992)	Phthalat Dioxygenase Reduktase	Q05182
3	<i>Bacillus subtilis</i> (Kunst <i>et al.</i> , 1997)	Thioredoxin Reduktase	P80880
4	<i>Escherichia coli K12</i> (Russel und Model, 1988)	Thioredoxin Reduktase	P0A9P4
5	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Jacquot <i>et al.</i> , 1994)	Thioredoxin Reduktase	Q39243
6	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Kubo <i>et al.</i> , 1993)	Glutathion Reduktase	P48641
7	<i>Escherichia coli K12</i> (Greer und Perham, 1986)	Glutathion Reduktase	P06715
8	<i>Homo sapiens</i> (Krohne-Ehrich <i>et al.</i> , 1977)	Glutathion Reduktase	P00390
9	<i>Bacillus subtilis</i> (Seo <i>et al.</i> , 2004)	Ferredoxin Reduktase	O05268
10	<i>Bacillus subtilis</i> (Kunst <i>et al.</i> , 1997)	Ferredoxin Reduktase	O31475
11*	<i>Streptomyces coelicolor</i> (Chun <i>et al.</i> , 2007)	Ferredoxin Reduktase	Q9RK35
12*	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Ferredoxin	Q9FC69



	(Lei <i>et al.</i> , 2004)	Reduktase	
13*	<i>Streptomyces coelicolor</i> (Lei <i>et al.</i> , 2004)	Ferredoxin Reduktase	Q7AKN6
14*	<i>Escherichia coli</i> (Jenkins und Waterman, 1994)	Ferredoxin Reduktase	P28861
15	<i>Azotobacter vinelandii</i> (Isas <i>et al.</i> , 1995)	Ferredoxin Reduktase	Q44532
16*	<i>Pseudomonas putida</i> (Peterson <i>et al.</i> , 1990)	Ferredoxin Reduktase	P16640
17*	<i>Mycobacterium</i> HE5 (Sielaff und Andreesen, 2005b)	Ferredoxin Reduktase	Q5RLM4
18*	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (McLean <i>et al.</i> , 2003)	Ferredoxin Reduktase	O05783
19	<i>Mycobacterium leprae</i> (Cole <i>et al.</i> , 2001)	Ferredoxin Reduktase	O33064
20	<i>Mus musculus</i> (Itoh <i>et al.</i> , 1995)	Ferredoxin Reduktase	Q61578
21*	<i>Rattus norvegicus</i> (Sagara <i>et al.</i> , 1999)	Ferredoxin Reduktase	P56522
22*	<i>Bos taurus</i> (Hannemann <i>et al.</i> , 2007)	Ferredoxin Reduktase	P08165
23*	<i>Homo sapiens</i> (Black <i>et al.</i> , 1993)	Ferredoxin Reduktase	P22570
24*	<i>Drosophila melanogaster</i> (Freeman <i>et al.</i> , 1999)	Ferredoxin Reduktase	Q9V3T9
25*	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Lacour <i>et al.</i> , 1998)	Ferredoxin Reduktase	P48360
26*	<i>Pisum sativum</i> [Lacour, 1999 #521]	Ferredoxin Reduktase	P10933
27*	<i>Anabaena PCC 711</i> (Jenkins <i>et al.</i> , 1997)	Ferredoxin Reduktase	P21890
28*	<i>Spinacia oleracea</i> (Hannemann <i>et al.</i> , 2007)	Ferredoxin Reduktase	P00455
A	<i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Goldman <i>et al.</i> , 2006)	Putative Ferredoxin Reduktase	Q1D181 MXAN_5449
B	<i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Goldman <i>et al.</i> , 2006)	Ferredoxin Reduktase	Q1CX40 MXAN_6919
C	<i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Goldman <i>et al.</i> , 2006)	Oxidoreduktase, NADH-bindend	Q1DEA4 MXAN_0753
D	<i>Myxococcus xanthus</i> DK1622 (Goldman <i>et al.</i> , 2006)	Putative Phthalat Dioxygenase Reduktase	Q1CWA5 MXAN_7205

## 2.2.2. Gentechnische Manipulationen


Alle gentechnischen Arbeitsschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, nach Standardmethoden durchgeführt (Sambrook und Russell, 2001). Die verwendeten Restriktionsendonukleasen (*Eco* RI, *Hind* III, *Nco* I, *Pvu* I) stammten von Promega.

### 2.2.2.1. Amplifikation der ausgewählten Gene

Die ausgewählten Gene wurden mittels PCR mit genomischer DNA von *Sorangium cellulosum* So ce56 als Matrize und den entsprechenden Primern amplifiziert. Jedes Gen wurde einmal mit und einmal ohne C-terminalen *His*<sub>6</sub>-tag amplifiziert. Als DNA Polymerase wurde aufgrund des hohen GC Gehaltes (durchschnittlich 71,4% für *S. cellulosum* So ce56, (Schneiker *et al.*, 2007)) die Phusion DNA Polymerase der Firma Finnzymes mit einem speziellen GC Puffer verwendet. Ein Ansatz enthielt:

1,0 µl	Genomische DNA
10,0 µl	GC Puffer (5x)
2,0 µl	dNTPs (5mM)
1,0 µl	Primer vorwärts (10 µM)
1,0 µl	Primer rückwärts (10 µM)
0,5 µl	Phusion Polymerase (2 U/µl)
1,5 µl	DMSO
33,0 µl	H <sub>2</sub> O

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. 98°C für 30 s
  2. 98°C für 10 s
  3. \* 50°C für 35 s
  4. 72°C für 30s/kb
  5. 72°C für 10 min
- 

\* Zur Amplifikation des *fdx8* Gens wurde eine Annealing Temperatur von 67°C verwendet.

### 2.2.2.2. Isolierung der DNA-Fragmente und Ligation

Nach erfolgreicher Amplifikation und Isolierung aus einem Agarosegel mit dem Kit "NucleoSpin Extract 2 in 1" von Qiagen wurden die PCR-Produkte in den Vektor

pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) einkloniert. Im Anschluss an die Zwischenklonierung wurden die Fragmente über die während der PCR generierten Restriktionsstellen ausgeschnitten, wiederum gereinigt und dann mit dem "Fast-Link™ DNA Ligation Kit" (Epicentre) nach Angaben des Herstellers in die entsprechend vorbereiteten Expressionsvektoren ligiert. Eine Liste der erstellten Plasmide ist im Anhang (Abschnitt 6.3.) zu finden.

#### **2.2.2.3. Plasmidreinigung und DNA-Konzentrationsbestimmung**

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Kit NucleoSpin Plasmid QuickPure oder das Kit Nucleobond Plasmid Purification AX 100 der Firma Machery & Nagel gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration der isolierten DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt (Sambrook und Russell, 2001).

#### **2.2.2.4. DNA-Sequenzierung**

Die Identität der Inserts wurde entweder durch Sequenzierung der Zwischenklonierungsvektoren und/oder der Expressionsvektoren sichergestellt (siehe Anhang, Abschnitt 6.3.). Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG-Biotech durchgeführt.

#### **2.2.2.5. Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen und Transformation**

Die Herstellung elektrokompetenter sowie chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte mit Abwandlungen nach den von Sambrook et al. beschriebenen Methoden (Sambrook und Russell, 2001). Bei den Klonierungsschritten wurden *E. coli* TOP10 mittels Elektroporation transformiert, da mit dieser Methode eine deutlich höhere Transformationseffizienz erreicht werden kann (Fregel *et al.*, 2008). Für die heterologe Expression wurden die Bakterien mittels der Hitzeschockmethode transformiert.

### 2.2.2.6. Bakterienkultivierung und heterologe Proteinexpression

Die *E. coli* Bakterien wurden, falls nicht anders angegeben, in einem komplexen Flüssigmedium (Nährbouillon I, Sifin) bzw. auf Agarplatten (Nähragar, Sifin) bei 37°C kultiviert. Die Zelldichte der Flüssigkulturen wurde spektroskopisch anhand der optischen Dichte (OD) der Zellsuspension gegen reine Nährlösung bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt.

Für die heterologe Proteinexpression wurden frisch transformierte *E. coli* Zellen verwendet. Mit den transformierten Zellen wurde zunächst eine Vorkultur angeimpft, die über Nacht in Nährmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum unter Schütteln (180 UpM) inkubiert wurde. Die Hauptkultur wurde mit 1/50 Volumenteil Vorkultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 1 bei 37°C geschüttelt (180 UpM). Anschließend erfolgte die Induktion durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM und die Expression unter den für das jeweilige Gen typischen Bedingungen, die in dieser Arbeit bestimmt wurden und im Ergebnisteil (Tabelle 3.2.1) aufgeführt sind. Nach Ende der Expressionszeit wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 4000 g für 20 min geerntet und das erhaltene Zellpellet bei -20°C gelagert.

### 2.2.3. Proteinreinigung

Die bei -20°C aufbewahrten Zellpellets wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend in dem jeweiligen Lysepuffer resuspendiert und mit dem Serin-Proteaseinhibitor PMSF in einer Endkonzentration von 1mM PMSF versetzt. Die Bakterienzellen wurden durch eine 20-minütige Ultraschallbehandlung (mit einer Amplitude von 25 µm, einer Pulsdauer von 30 s und einer Ratio von 1) unter ständiger Kühlung und Rühren mit dem Ultraschallgerät "USD 30" (WV) aufgeschlossen. Das Lysat wurde 30 min bei 30.000 UpM (Rotor P30, Ultrazentrifuge Hitachi himac CP75β) und 4 °C zentrifugiert. Die heterolog exprimierten Proteine wurden aus dem Überstand durch verschiedene nachfolgende Chromatographieschritte gereinigt, die allesamt bei 4°C durchgeführt wurden.

### 2.2.3.1. Reinigung *His<sub>6</sub>-getaggtter* Proteine

Bei der Reinigung der mit einem C-terminalen *His<sub>6</sub>-tag* versehenen Proteine wurde Puffer A (50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0 mit 300 mM NaCl) als Lysepuffer verwendet. Der Überstand nach der Ultrazentrifugation wurde auf eine mit TALON™ Resin (Clontech) befüllte, mit Puffer A äquilibrierte IMAC-Säule geladen; anschließend wurde gemäß den Angaben des Herstellers die Säule bis zum Wiedererreichen der Basislinie mit Puffer A gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit einem linearen Gradienten von 0 – 100% Puffer B (50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, mit 300 mM NaCl und 150 mM Imidazol) eluiert. Die Flussrate betrug 2 ml/min. Fraktionen, die das heterolog exprimierte Protein enthielten, wurden vereinigt und durch Zentrifugation bei 4000g und 4°C in „Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices“ (Millipore) mit der entsprechenden Ausschlussgröße (10 kD für Fdx; 30 kD für FdR) auf 0,5 – 1 ml eingeeengt. Anschließend wurde die Probe mit 100 µl 40%-Glucoselösung beschwert und einer Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 75 pg Säule und Puffer C (50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4) bei einer Flussrate von 0,1 ml/min unterzogen. Der Reinheitsindex (bei Fdx der Quotient  $A_{\text{Fdx-typisches Maximum}}/A_{276\text{nm}}$ ; bei FdR der Quotient  $A_{276\text{nm}}/A_{\text{FdR-typisches Maximum}}$ ) der Fraktionen wurde spektroskopisch bestimmt und geeignete Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und bei –20°C gelagert.

### 2.2.3.2. Reinigung *GST-getaggtter* Proteine

Die Reinigung der mit einem N-terminalen *GST-tag* versehenen Proteine erfolgte nach den Angaben von GE Healthcare für die Reinigung *GST-getaggtter* Proteine. Als Lysepuffer wurde Puffer D (PBS, pH 7,3: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit zusätzlich 1 mM EDTA) verwendet. Der Überstand nach der Ultrazentrifugation wurde auf eine mit Glutathione Sepharose (GE Healthcare) befüllte Säule mit einer Flussrate von 0,5 ml/min geladen, welche zuvor mit PBS äquilibriert wurde. Anschließend wurde die Säule mit PBS mit einer Flussrate von 2 ml/min gespült, bis alle unspezifisch gebundenen Proteine von der Säule gewaschen waren. Die Elution wurde mit derselben Flussrate mit Puffer E (50 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit 10 mM reduziertem Glutathion) durchgeführt. Geeignete Fraktionen wurden gesammelt und der Elutionspuffer gegen Puffer F („PreScission cleavage buffer“: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,5)

ausgetauscht. Anschließend wurde nach den Herstellerangaben PreScission Protease (GE Healthcare) zugegeben und die Mischung 12-16 h bei 4°C inkubiert, um ein effektives Abspalten des *GST-tags* zu gewährleisten. Danach wurde die Probe 1:10 mit PBS verdünnt und wiederum auf eine Glutathion Sepharose Säule gegeben, um den abgespaltenen *GST-tag* und die daran gebundene Protease von dem *S. cellulosum* So ce56 Protein abzutrennen. Der Durchlauf wurde durch Zentrifugation bei 4000 g und 4°C in „Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices“ (Millipore) auf 0,5 – 1 ml eingengt, die konzentrierte Probe mit 100 µl 40%-Glucoselösung beschwert und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Größenausschlusschromatographie erfolgte mit einer Superdex 75 pg Säule und Puffer C bei einer Flussrate von 0,1 ml/min. Der Reinheitsgrad (bei Fdx1 der Quotient  $A_{411\text{nm}}/A_{276\text{nm}}$ ; bei FdRB der Quotient  $A_{276\text{nm}}/A_{457\text{nm}}$ ) der gefärbten Fraktionen wurde spektroskopisch bestimmt und geeignete Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und bei -20°C eingefroren.

### 2.2.3.3. Reinigung von Einschlusskörpern (Inclusion bodies, ICB) des Fdx7

Da Fdx7 nicht in löslicher Form exprimiert wurde, sollte überprüft werden, ob das heterolog exprimierte Protein in Form von Einschlusskörpern vorliegt. Das hierfür verwendete Protokoll basiert auf dem von Sambrook beschriebenen Protokoll (Sambrook und Russell, 2001). Das Bakterienpellet wurde pro g Nassgewicht in 3 ml Puffer G (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) resuspendiert, mit PMSF versetzt und wie oben beschrieben mittels Ultraschall aufgeschlossen und zentrifugiert. Vom Überstand wurde eine Probe für die SDS-PAGE genommen. Das Pellet wurde in 50 ml eiskaltem Puffer H (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% (v/v) Triton X-100) aufgenommen, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 15 min bei 10.000 UpM (Rotor 19776) zentrifugiert. Vom Überstand wurde eine Probe für die SDS-PAGE genommen. Das Pellet wurde mit destilliertem Wasser gewaschen, nochmals zentrifugiert und in 40 ml Puffer I (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 8 M Harnstoff) resuspendiert. Die Probe wurde 1h bei 23°C gerührt bevor 9 Volumenteile Puffer J (50 mM  $K_2HPO_4$ , pH 10,7, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl) zugegeben wurden. Danach wurde die Probe 45 min gerührt, wobei der pH-Wert mit KOH auf 10,7 gehalten wurde. Anschließend wurde der pH-Wert mit HCl auf 8,0 eingestellt und die Probe wurde wiederum 45 min gerührt, bevor der abschließende Zentrifugationsschritt (15 min, 10.000 UpM, Rotor 19776) durchgeführt wurde. Sowohl vom Überstand als auch vom Pellet wurden Proben für die SDS-PAGE genommen.

#### 2.2.3.4. Ortsgerichtete Mutagenese, Expression und Reinigung von *S. pombe* Arh1

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass das AdR Homolog aus der Spaltheefe, Arh1, seinen Flavinkofaktor leicht verliert (Ewen, 2004). Daher wurde mit dem Stratagene QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit eine ortsgerechte Mutagenese durchgeführt, bei der das Alanin an Aminosäureposition 18 gegen Glycin ausgetauscht wurde. Hierdurch wurde das FAD-Bindemotiv der Arh1 (GXGXXG, X = beliebige Aminosäure) dem allgemeinen FAD-Bindemotiv (GXGXXG, X = beliebige Aminosäure) (Hanukoglu und Gutfinger, 1989; Dym und Eisenberg, 2001) angeglichen. Hierfür wurden die beiden Primer sarhpA18Gfor (TTCTGGGCCAGCTGGTTTTTACACAGCCCAC) und sarhpA18Grev (GTGGGCTGTGTA<sup>AAA</sup>ACCAGCTGGCCCAGAA) verwendet, mit deren Hilfe eine neue *Pvu* I Restriktionsstelle im Expressionsplasmid pTrc99A\_ arh1his generiert wurde. Diese diente zur Selektion geeigneter Mutanten durch Restriktion. Das Vorhandensein der Mutation im FAD-Bindemotiv wurde anschließend durch Sequenzierung des Inserts des resultierenden Expressionsvektors pTrc99A\_ arh1\_A18Ghis verifiziert. Da in der vorliegenden Arbeit nur mit der Mutante Arh1A18Ghis gearbeitet wurde, wird diese im Folgenden zur Vereinfachung als Arh1 bezeichnet.

Zur heterologen Expression wurden mit pTrc99A\_ arh1\_A18Ghis transformierte *E. coli* JM109 in TB Medium (Sambrook und Russell, 2001) mit 100 µg/ml Ampicillin bis zum Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 1 bei 37°C geschüttelt (180 UpM). Anschließend erfolgte die Induktion durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM und die Expression für 72 h bei 30°C. Nach Ende der Expressionszeit wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 4000 g für 20 min geerntet und das erhaltene Zellpellet bei -20°C gelagert. Zur Reinigung der Arh1 wurden die Bakterien wie in Abschnitt 2.2.3. beschrieben lysiert. Arh1 wurde mit Hilfe des C-terminalen *His*<sub>6</sub>-tags über IMAC gereinigt. Als Lysepuffer/Waschpuffer wurde 20 mM Tris/HCl Puffer, pH 8,0, mit 100 mM Natriumchlorid und 10 mM Imidazol verwendet, als Elutionspuffer 50 mM Natriumacetat, pH 4,0 mit 300 mM Natriumchlorid. Das eluierte Protein wurde mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 umgepuffert und bei -20°C gelagert. Die Reinheit der Arh1 Präparationen wurde mittels SDS-PAGE bzw. durch den Reinheitsindex ( $A_{276nm}/A_{450nm}$ ) überprüft. Die Konzentration des Holoproteins wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten der AdR ( $\epsilon_{450nm} = 11\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ , (Suhara *et al.*, 1982)) abgeschätzt.

## **2.2.4. Proteinanalysen**

### **2.2.4.1. Proteinbestimmung**

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte mit dem BC Assay der Firma Uptima gemäß den Herstellerangaben.

### **2.2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE wurde zur Überprüfung der Reinigung der Proteine in 15%-igen denaturierenden Polyacrylamid-Gelen nach Laemmli (Laemmli, 1970) in einer vertikalen Hoefer Mighty-Small-Mini-Gel-Apparatur (Amersham Pharmacia Biotech) bei 60 mA durchgeführt.

### **2.2.4.3. Isoelektrische Fokussierung (IEF)**

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit Anodenlösung 3, Kathodenlösung 10 und dem IEF Marker 3-10 der Firma Serva in einer Multiphor II Kammer (Amersham Pharmacia Biotech) mit vorgefertigten Servalyt Precotes Gelen (pH 3-10) durchgeführt. Die Gele wurden bei 500 V präfokussiert bis die Stromstärke auf 1-2 mA abgefallen war. Anschließend wurden die Proben und der Marker aufgetragen und die Elektrophorese bei 800 mV für ca. 2 h durchgeführt. Danach wurden die Gele für 10 min mit 20 % Trichloressigsäure fixiert, mit destilliertem Wasser gewaschen und 5 min mit Coomassie Blue G250 (Merck) gefärbt. Nach dem Färben wurden die Gele mit destilliertem Wasser abgespült und entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden. Die Auswertung der Gele wurde freundlicherweise von Herrn Dipl. Biologe Martin Wörner mit der Software „PDQuest8.0.1“ durchgeführt, indem den Markerbanden der jeweilige pI zugeordnet wurde.



## 2.2.5. Spektroskopische Untersuchungen

### 2.2.5.1. UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Spektren der gereinigten, oxidierten Proteine in Puffer C wurden an einem Shimadzu Zweistrahlphotometer UV-2100 (Kyoto) aufgenommen. Mit den im BC Assay (Abschnitt 2.2.4.1.) erhaltenen Werten wurden die Extinktionskoeffizienten an den charakteristischen Maxima der Proteine bestimmt; außerdem wurden durch Vergleich der allgemeinen Proteinabsorption der gereinigten Proteine bei 276 nm mit den charakteristischen Maxima die typischen Q-Werte (Tabelle 3.2.2) als Maß für den Reinheitsgrad der einzelnen Proteine berechnet. Bei den folgenden Reinigungen wurde der Reinheitsgrad über die Q-Werte und die Konzentration mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz und den jeweiligen Extinktionskoeffizienten bestimmt.

UV/Vis-Spektren der Ferredoxin Reduktasen mit Natriumdithionit, NADPH oder NADP<sup>+</sup> wurden im Wellenlängenbereich von 250 nm – 850 nm aufgenommen. Der für das Ansetzen der Reduktionsmittellösungen bzw. für die Verdünnung der Proben verwendete 10 mM Kaliumphosphatpuffer wurde vor Verwendung 1 h mit Argon begast, um ihn sauerstofffrei zu machen. Die Proteinstammlösungen (ca. 100 µM) wurden vor Verwendung mindestens 30 min unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Die Zugabe der Reduktionsmittel bzw. des NADP<sup>+</sup> erfolgte ebenfalls unter anaeroben Bedingungen. Anschließend wurden UV-Vis-Spektren der Proben mit und ohne Sauerstoffkontakt nach unterschiedlichen Zeiten aufgenommen.

### 2.2.5.2. CD-Spektroskopie

CD-Spektren der Ferredoxine und der Ferredoxin Reduktasen wurden bei 23 °C mit einem Jasco J720 Spektropolarimeter mit einem Jasco PTC348 Temperaturregler aufgenommen. Alle Messungen erfolgten in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm. Die Probenkammer wurde kontinuierlich mit Stickstoff gespült (3 l/min) um den Hintergrund zu reduzieren. Die Spektren wurden jeweils dreimal aufgenommen und gemittelt. Als Kontrolle wurde das Spektrum von 10 mM Kaliumphosphatpuffer aufgenommen; dieses wurde anschließend von den Proteinspektren substrahiert und die entstandenen Kurven geglättet. Die Proben der Flavoproteine und der [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine enthielten 100µM Protein in

10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4. Die Fdx2 Probe hingegen war 1500  $\mu\text{M}$ , die Fdx8 Probe 540  $\mu\text{M}$ .

Um die thermische Denaturierung der Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen zu untersuchen, wurden CD Messungen durchgeführt, bei denen die temperaturabhängige Änderung der Elliptizität an einer bestimmten, für das jeweilige Protein charakteristischen Wellenlänge verfolgt wurde. Die gewählte Wellenlänge und der jeweilige Temperaturbereich sind im Ergebnisteil aufgeführt. Die erhaltenen Kurven wurden mit dem Programm „SigmaPlot 2001“ mittels einer nichtlinearen Regression ausgewertet (Privalov, 1979).

### 2.2.5.3. ESR-Spektroskopie

ESR-Spektren der gereinigten Proteine wurden mit einem Bruker ESP300 Spektrometer (X-band, 9,5 GHz) mit einem ITC 4 Temperaturkontrollgerät (Oxford Instruments) unter Kühlung mit flüssigem Helium (continuous flow helium cryostat ESR 900) aufgenommen. In Standardmessungen wurden folgende Parameter verwendet: Modulationsfrequenz: 100 kHz; Mikrowellenleistung: 2 mW; Modulationsamplitude: 5 G und Zeitkonstante: 41 ms. Die Mikrowellenfrequenz wurde mit einem HP 5350B frequency counter gemessen. Andere individuelle oder abweichende Parameter sind im Ergebnisteil bei den jeweiligen Messungen angegeben. Alle Proteine wurden in oxidiertem (unbehandeltem) sowie in reduzierter (nach Zugabe von Natriumdithionit) Form gemessen; die Ferredoxin Reduktasen wurden außerdem mit NAD(P)H titriert. Die verwendeten Proteinproben lagen in einer Konzentration von ca. 150  $\mu\text{M}$  vor; es wurden jeweils 180  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung in ESR Quarzröhrchen (Wilma) überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die apparenten g-Faktoren der Ferredoxin Reduktasen wurden mit dem Programm „WinEPR“ (Bruker) bestimmt. Die Simulation der Ferredoxin-Spektren zur Bestimmung der g-Faktoren wurde freundlicherweise von Dr. rer. nat. Reinhard Kappl (Arbeitsgruppe Prof. Dr. rer. nat. J. Hüttermann) am Institut für Biophysik des Universitätsklinikums in Homburg mit den Programmen „Simfonia“ oder „Xsophe“ (Bruker) durchgeführt.

## 2.2.6. Untersuchung der prostethischen Gruppen

### 2.2.6.1. Qualitative Flavinbestimmung mittels LC-MS

Um die Identität des in den potentiellen Ferredoxin Reduktasen enthaltenen Flavins zu bestimmen, wurde die prostethische Gruppe aus dem Protein herausgelöst und anschließend einer LC-MS Analyse unterzogen. Im Fall der FdRA wurde hierzu eine 10  $\mu\text{M}$  Proteinlösung lichtgeschützt 10 min bei 100° C inkubiert, auf Eis abgekühlt und 10 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde durch Evaporation konzentriert und anschließend mit Methanol auf eine Endkonzentration von ca. 10  $\mu\text{M}$  verdünnt. Das zweite Flavoprotein FdRB wurde unmittelbar in Methanol auf eine Endkonzentration von etwa 10  $\mu\text{M}$  verdünnt und 5 min bei 23 °C inkubiert. Das denaturierte Protein wurde anschließend durch Zentrifugation abgetrennt. Die LC-MS Messungen selbst wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. Olena Perlova und Dr. rer. nat. Daniel Krug (Arbeitsgruppe Prof. Dr. rer. nat. Rolf Müller) am Institut für Pharmazeutische Biotechnologie der Universität des Saarlandes mit einem HCT Ionenfallen-Massenspektrometer von Bruker durchgeführt, bei dem die Probeneinführung durch ein Agilent 1100 series System erfolgte. Für die Chromatographie wurde eine RP Säule von Nucleodur (C18, 125 × 2 mm, 3  $\mu\text{m}$  Partikelgröße mit einer C18, 8 mm × 3 mm, 5  $\mu\text{m}$  Vorsäule) verwendet. Es wurde ein Gradient von 5% B (0,1% Ameisensäure in Acetonitril) bei 2 min zu 95% B innerhalb von 17 min gefahren, gefolgt von einem Spülschritt von 95% B für 4 min. Lösemittel A war dabei 0,1% Ameisensäure in Wasser. Die Flavinkomponente wurde durch Vergleich mit der Retentionszeit und den MS Daten der kommerziell erhältlichen Referenzsubstanzen FAD (Na Salz, Serva) und FMN (Riboflavin 5'-Monophosphat, Na Salz, Sigma-Aldrich) identifiziert. FAD wurde im negativen Ionisierungsmodus ( $[\text{M}-\text{H}]^- = 784,2$  bei 8,0 min) und FMN im positiven Ionisierungsmodus ( $[\text{M}+\text{H}]^+ = 457,1$  bei 8,3 min) detektiert.

### 2.2.6.2. Quantitative Flavinbestimmung mittels UV/Vis-Spektroskopie

Die quantitative Bestimmung des FAD Gehaltes der Ferredoxin Reduktasen erfolgte mit einem Shimadzu Zweistrahlphotometer UV-2100. Es wurden unterschiedliche Verdünnungen der Proteine in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, hergestellt und deren UV/Vis-Spektren aufgezeichnet. Anschließend wurden die Proben lichtgeschützt 10 min bei 100° C inkubiert,

auf Eis abgekühlt und 10 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert. Vom Überstand wurden anschließend ebenfalls UV/Vis-Spektren aufgezeichnet. Die Konzentration der Proteine und des freien FAD wurde mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz und den jeweiligen Extinktionskoeffizienten berechnet und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Für die FAD Konzentrationsbestimmung wurde der Extinktionskoeffizient für FAD  $\epsilon_{450} = 11,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  zugrunde gelegt (Chapman und Reid, 1999).

### 2.2.6.3. Eisenbestimmung mittels ICP-OES

Zur Bestimmung des Eisengehaltes der Ferredoxine wurde die optische Emissionsspektrometrie mittels induktiv gekoppeltem Plasma (engl. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES) eingesetzt.

Die Proben wurden folgendermaßen vorbereitet, um das Eisen von der organischen Komponente zu trennen: Da die Eisen-Schwefel Cluster von Ferredoxinen säurelabil sind, wurde ein Volumenteil Proteinlösung bekannter Konzentration mit einem Volumenteil 20 % Trichloressigsäure vermischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das denaturierte Protein wurde anschließend durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 10.000 g und 20°C sedimentiert und der eisenhaltige Überstand abgetrennt. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit je einem Volumenteil 5 % Trichloressigsäure gewaschen. Der Überstand aus den einzelnen Zentrifugationsschritten wurde vereinigt und für die ICP Messung eingesetzt. Da Trichloressigsäure selbst einen beträchtlichen Eisenanteil aufweist, wurde zum einen jeweils eine Kontrolle, die nur Puffer enthielt, ebenso wie die Ferredoxinproben behandelt und zum anderen wurden die Eisenproben für die Erstellung der Eichkurve („Iron Atomic Spectroscopy Standard Solution“ von Fluka) in 7,5% Trichloressigsäure angesetzt. Die ICP Messungen selbst wurden freundlicherweise von Frau Traudel Allgayer (Arbeitsgruppe Prof. Dr. rer. nat. Horst P. Beck) am Institut für Anorganische und Analytische Chemie und Radiochemie der Universität des Saarlandes mit einem mit Argon Plasma arbeitenden optischen Emissionsspektrometer Optima 2000 DV von Perkin Elmer durchgeführt. Jedes Protein wurde in mindestens drei unterschiedlichen Protein- bzw. Eisenkonzentrationen gemessen und die Werte gemittelt.

### **2.2.7. Reaktion der Ferredoxin Reduktasen mit NAD(P)H: Ferricyanide Assay**

Um die  $K_m$  Werte von FdRA und FdRB für NAD(P)H zu bestimmen, wurde an einem Shimadzu Zweistrahlphotometer UV-2100 die Reduktion von Ferricyanid bei 420 nm verfolgt. Die Messungen wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, bei 23 °C mit 1-2  $\mu$ M FdR, 2 mM Kaliumferricyanid und unterschiedlichen Konzentrationen an NAD(P)H durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NAD(P)H gestartet und der Reaktionsverlauf über einen Zeitraum von 60 s verfolgt. Für jede NAD(P)H Konzentration wurden 3 Messungen durchgeführt. Für die Bestimmung der Ferricyanidkonzentration wurde ein Extinktionskoeffizient von  $\epsilon_{420} = 1020 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  angenommen (McLean *et al.*, 2003). Die Auswertung der Kurven und die Bestimmung der  $K_m$  Werte erfolgte mit der Software „Origin“ (Microcal).

### **2.2.8. Untersuchung potentieller Protein-Protein Interaktionen in Cytochrom P450 Systemen mittels *in vitro* Rekonstitution**

Um zu überprüfen, ob die Ferredoxin Reduktasen mit den Ferredoxinen und diese wiederum mit Cytochromen P450 interagieren, wurden *in vitro* Cytochrom P450 abhängige Substratumsatz Assays durchgeführt. Hierbei katalysiert ein Klasse I Cytochrom P450 die Umsetzung eines Substrates; damit die Reaktion ablaufen kann, muss jedoch eine funktionelle Elektronentransferkette, bestehend aus einer Ferredoxin Reduktase und einem Ferredoxin, vorhanden sein, die das Cytochrom P450 Enzym mit den nötigen Elektronen versorgt.

#### **2.2.8.1. CYP11A1 abhängiger Substratumsatz**

In Anlehnung an Sugano (Sugano *et al.*, 1989) wurde ein CYP11A1 abhängiger Substratumsatz mit einigen Modifikationen durchgeführt. Ein Ansatz enthielt 0,5  $\mu$ M FdR, 5  $\mu$ M Fdx, 0,5  $\mu$ M CYP11A1 und 400  $\mu$ M 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) sowie ein NADPH-regenerierendes System (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Glucose-6-Phosphat, 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) in 50 mM HEPES, 0,05% Tween 20, pH 7,4. Die Reaktion wurde durch

Zugabe von NADPH (Endkonzentration 200  $\mu\text{M}$ ) gestartet und nach 45 min Inkubation bei 37 °C durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Chloroform gestoppt. Es wurde Cortisol als Interner Standard in einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Anschließend wurden die Proben zweimal mit 500  $\mu\text{l}$  Chloroform extrahiert und die Chloroformphasen vereinigt. Das Lösemittel wurde eingedampft, das Sediment in 200  $\mu\text{l}$  Acetonitril resuspendiert und mittels HPLC untersucht.

Das verwendete HPLC-System bestand aus einer Pumpe, einer Probennahmeverrichtung und einem UV-975 UV/Vis-Detektor der Jasco 900er Baureihe. Zur Auftrennung wurde eine RP Säule (Waters 3,9 x 150 mm Säule WAT036975) und als mobile Phase eine entgaste Acetonitril:Isopropanol Mischung (30:1) verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1,0 ml/min Die Säulentemperatur wurde mit dem Säulenofen Modell K-1 der Firma Techlab konstant bei 40 °C gehalten. Das Substrat und die Produkte wurden bei 270 nm detektiert. Die prozentuale Produktbildung wurde ermittelt, indem die Fläche des Produktpeaks zur Summe der Flächen des Produkt- und des Substratpeaks ins Verhältnis gesetzt wurde.

#### **2.2.8.2. CYP260A1 abhängiger Substratumsatz**

Der CYP260A1 abhängige Substratumsatz wurde in einem Volumen von 500  $\mu\text{l}$  in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems (1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM Glucose-6-Phosphat, 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) durchgeführt. Ein Ansatz enthielt 2  $\mu\text{M}$  FdR, 20  $\mu\text{M}$  Fdx, 0,25  $\mu\text{M}$  CYP260A1 und 100  $\mu\text{M}$  Nootkaton. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NADPH (Endkonzentration 200  $\mu\text{M}$ ) gestartet und nach 90 min Inkubation bei 30 °C durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Chloroform gestoppt. Die Proben wurden zweimal mit 500  $\mu\text{l}$  Chloroform extrahiert und die Chloroformphasen vereinigt. Das Lösemittel wurde eingedampft, das Sediment in 200  $\mu\text{l}$  Acetonitril resuspendiert und mittels HPLC untersucht. Für jede Fdx/FdR Kombination wurden mindestens drei Reaktionen angesetzt.

Das verwendete HPLC-System entsprach dem unter 2.2.8.1. beschriebenen System. Zur Auftrennung wurde eine RP Säule (Waters 3,9 x 150 mm Säule WAT036975) und eine entgaste Acetonitril:Wasser Mischung (40:60) verwendet. Fließgeschwindigkeit betrug 1,0 ml/min und die Säulentemperatur 40°C. Das Substrat und die Produkte wurden bei 240 nm detektiert. Das Substrat konnte durch eine Referenzprobe identifiziert werden, zur Identifizierung der Produkte wurden LC-MS Messungen von Dr. rer. nat. Daniel Krug (Arbeitsgruppe Prof. Dr. rer. nat. Rolf Müller) am Institut für Pharmazeutische

Biotechnologie der Universität des Saarlandes durchgeführt. Die apparative Ausstattung entsprach dabei derjenigen, die bei der Untersuchung der Flavinkofaktoren zum Einsatz kam. Die Auftrennung erfolgte mit einer RP C18 Säule (Luna HST, 100 x 2 mm, 2,5 µm Partikelgröße; Phenomenex) und einem Gradienten von 5% - 95% B (0,1% Ameisensäure in Acetonitril) bei einer Flussrate von 0,4 ml/min. Lösemittel A war Wasser mit 0,1% Ameisensäure. Die massenpektrometrische Detektion erfolgte im positiven Ionisierungsmodus ( $[M+H]^+ = 235/m/z$  oder  $251/m/z$  für mono- oder dihydroxylierte Produkte).

### **2.2.8.3. Messung des NADPH Verbrauchs beim CYP260A1 abhängigen Substratumsatz**

Der NADPH Verbrauch der vier Kombinationen – Fdx2-FdRB, Fdx8-FdRB, Fdx2-FdRA und Fdx8-FdRA – wurde spektralphotometrisch untersucht. Die Reaktionsansätze enthielten 2 µM FdR, 20 µM Ferredoxin und 0,25 µM CYP260A1 in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.4. Die Substratkonzentration wurde von 0 µM bis zu 100 µM variiert. Nach Zugabe von NADPH (Endkonzentration 200 µM) wurde an einem Shimadzu Zweistrahlphotometer UV-2100 die Absorptionsänderung bei 340 nm für 5 min verfolgt. Der NADPH Verbrauch wurde mithilfe des molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  berechnet. Für jede Konzentration wurden wenigstens drei Messungen durchgeführt. Die NADPH Oxidationsraten (angegeben in mol NADPH oxidiert pro Minute pro mol CYP) wurden gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen aufgetragen und mit der Software "Origin" (Microcal) hyperbolisch gefittet, um die apparenten  $K_m$  und  $k_{cat}$  Werte zu erhalten.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Bioinformatische Analysen

Um potentielle Elektronenmediatorproteine zu identifizieren, wurden zunächst bioinformatische Untersuchungen der genomischen Sequenz von *S. cellulorum* So ce56 durchgeführt. Die Untersuchung des Genoms auf das Vorhandensein möglicher Elektronentransportproteine aus Cytochrom P450 Systemen führte zur Identifizierung von acht potentiellen Ferredoxingenen und zwei potentiellen Ferredoxin Reduktasegenen. Eine Übersicht über die bei der Suche verwendeten Sequenzen ist im Anhang (Abschnitt 6.1) zu finden. Neben den Komponenten der Klasse I Cytochrom P450 Systeme wurde auch nach Flavodoxingenen sowie CPR Genen gesucht, jedoch konnten keine derartigen Gene im Genom von *S. cellulorum* So ce56 identifiziert werden.

Die acht identifizierten Ferredoxingene sowie die zwei Ferredoxin Reduktasegene sind über das gesamte Bakterienchromosom verstreut und befinden sich weder in räumlicher Nähe zueinander noch zu einem der von Herrn M. Sc. med. microbiol. Yogan Kathri identifizierten einundzwanzig *S. cellulorum* So ce56 CYP Gene (siehe Abbildung 3.1.1).

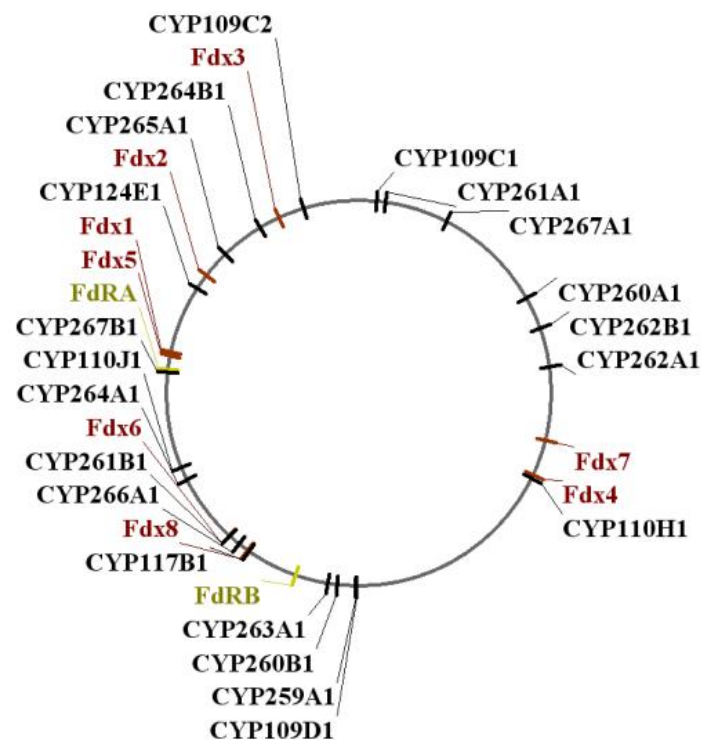


Abbildung 3.1.1: Verteilung der potentiellen Komponenten der Cytochrom P450 Systeme auf dem Chromosom von *S. cellulorum* So ce56



### 3.1.1. Untersuchung der *Sorangium cellulosum* So ce56 Ferredoxine

#### Umgebung der Ferredoxingene

Um Hinweise auf mögliche Funktionen der *S. cellulosum* So ce56 Ferredoxine zu erhalten, wurden Informationen über die direkte Umgebung der einzelnen Gene zusammengetragen. Das *fdx1* Gen *sce7334* bildet vermutlich ein Operon zusammen mit den Genen *sce7333* und *sce7332*, deren Produkte als putatives Chaperon HscA bzw. Cochaperon Hsc20 annotiert sind. Angrenzend an diese Gene befinden sich mehrere Gene, die Schlüsselproteine der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese kodieren (die putativen *Scaffold* Proteine *sufA*: *sce7331* und *iscU*: *sce7330* und eine Cysteindesulfurase: *sce7329*) und wahrscheinlich ebenfalls dem Operon angehören. Diese genomische Organisation der für die Assemblierung der Eisen-Schwefel-Cluster notwendigen Gene des sogenannten *isc* Operons ist typisch (Lill und Mühlhoff, 2006) und spricht für eine Beteiligung des Fdx1 an diesem elementaren zellphysiologischen Prozess.

Im Hinblick auf die anderen beiden in *S. cellulosum* So ce56 identifizierten [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine, Fdx3 und Fdx5, erlaubt die genomische Umgebung der Gene *sce9225* und *sce7304* keine Rückschlüsse auf mögliche Aufgaben der entsprechenden Genprodukte. Das *fdx3* Gen *sce9225* bildet vermutlich ein Operon mit den Genen *sce9224* und *sce9223*, die ein hypothetisches Protein unbekannter Funktion und eine putative Amidohydrolase kodieren. Das *fdx5* *sce7304* Gen hingegen scheint einzeln transkribiert zu werden, da die beiden nächstgelegenen Gene entweder gegenläufig angeordnet (*sce7303*; Genprodukt: vermutlich 2-Polyprenyl-6-methoxyphenolhydroxylase) oder aber zu weit entfernt (*sce7305*; Genprodukt: putative Phosphoenolpyruvatmutase, Abstand 333 bp) sind.

Auch im Falle der in *S. cellulosum* So ce56 identifizierten Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine war es nicht möglich, anhand der genomischen Umgebung der entsprechenden Gene eindeutig Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen Ferredoxine zu ziehen oder ein Ferredoxin zu bestimmen, das mit hoher Wahrscheinlichkeit die Rolle des Elektronenmediators in den *S. cellulosum* So ce56 Klasse I Cytochrom P450 Systemen übernimmt. Das *fdx2* Gen *sce8005* ist umgeben von Genen, die überwiegend für hypothetische Proteine unbekannter Funktion kodieren. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass *sce8005* einzeln transkribiert wird, da einerseits *sce8004* und die vorangehenden Gene gegenläufig zum *fdx2* Gen angeordnet sind und andererseits der Abstand zwischen *sce8005* und *sce8006*, das ein vermutetes sezerniertes Protein kodiert, mit 96 bp relativ groß ist. Das *fdx4* Gen *sce3039* scheint hingegen in einem Operon mit dem Gen *sce3038*, das eine

L-Aspartatoxidase kodiert, organisiert zu sein. Auch das *fdx6* Gen *sce5732* wird möglicherweise zusammen mit einem weiteren Gen, *sce5731*, transkribiert, aber die Annotation des Genproduktes von *sce5731* als hypothetisches glycinreiches Protein erlaubt keine Aussage über eine mögliche Funktion von Fdx6. Das Gen des putativen Dicluster-Typ Ferredoxins Fdx7, *sce2755*, liegt in einem Operon, das die Gene *sce2754* bis *sce2759* umspannt. Die unmittelbar an *sce2755* angrenzenden Gene kodieren ein Flavoprotein mit vermuteter Fumaratreduktase/Succinatdehydrogenase Aktivität (*sce2754*) und ein hypothetisches Protein mit einer Phycocyanobilin Lyase Aktivität (*sce2756*). Die übrigen drei Gene des potentiellen Operons kodieren ABC Transporterproteine. Bei näherer Untersuchung des *fdx7* Nachbargens *sce2754* fällt auf, dass bei einer Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der „Pfam“-Datenbank (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) nur eine Flavin-Bindedomäne, jedoch kein Bindemotiv für Eisen-Schwefel-Cluster gefunden wird. Ausgehend von der Struktur der *E. coli* Fumaratreduktase (Iverson *et al.*, 1999) wären jedoch zusätzlich drei verschiedene Eisen-Schwefel Zentren ([2Fe-2S], [4F-4S] und [3Fe-4S]) zu erwarten. Dies deutet darauf hin, dass Fdx7 möglicherweise als eine Untereinheit der Fumaratreduktase/Succinatdehydrogenase dient und dabei die beiden Nicht-[2Fe-2S]-Cluster bereitstellt. Das *fdx8* Gen *sce5549* schließlich könnte zu einem Operon gehören, das neben *sce5549* noch drei weitere Gene umfasst, deren Genprodukte als putatives Transkriptionsregulatorprotein der TenA Familie (*sce5546*) und als putative Membranproteine unbekannter Funktion (*sce5547* und *sce5548*) annotiert sind.

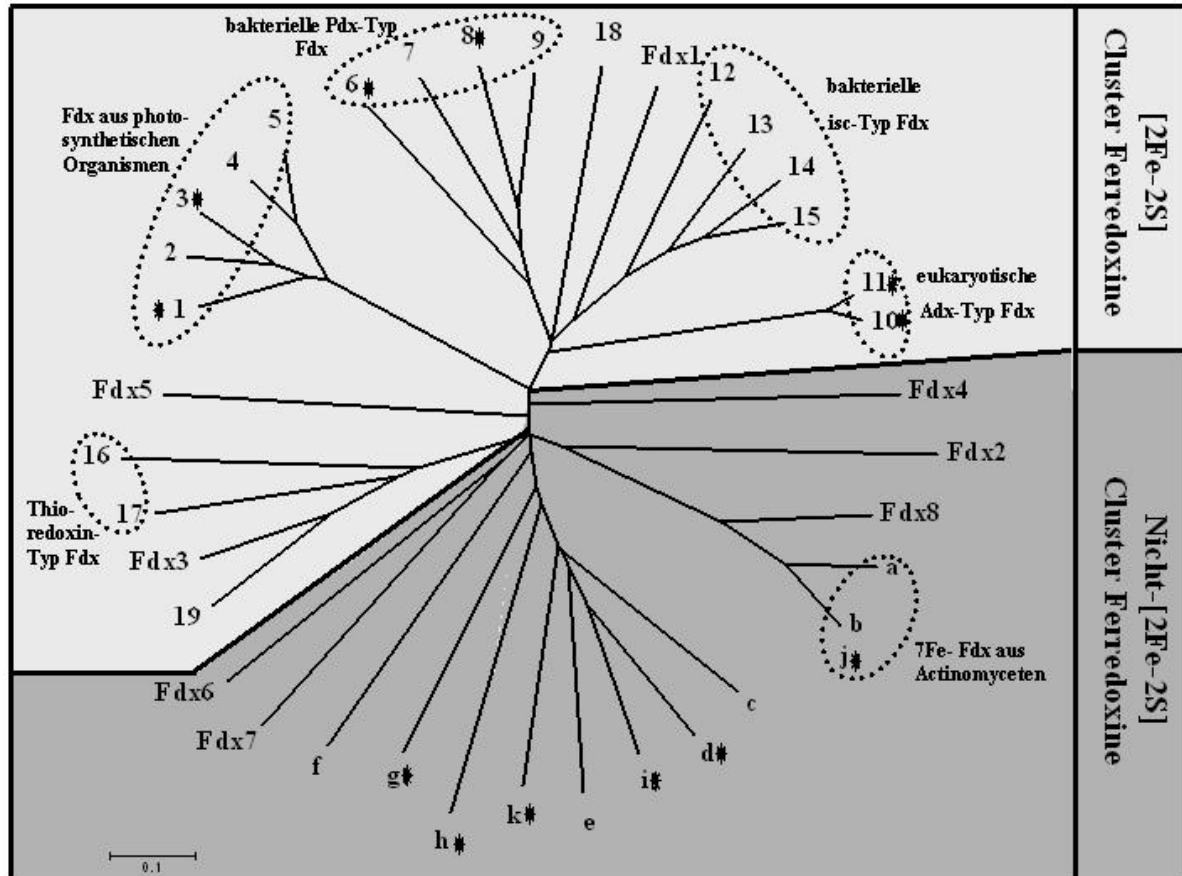
### **Untersuchung der abgeleiteten Proteinprimärstruktur der *Sorangium cellulosum* So ce56 Ferredoxine**

Ein Abgleich der von der DNA-Sequenz abgeleiteten Proteinprimärstruktur der Ferredoxine 1-8 mit der „Pfam“-Datenbank lieferte erste Hinweise auf den zu erwartenden Cluster-Typ (siehe Tabelle 3.1.1): Für die Ferredoxine 1 und 5 wurde das Vorhandensein eines [2Fe-2S]-Clusters vorhergesagt, wohingegen die Ferredoxine 2, 4, 6, 7 und 8 als Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine eingestuft wurden. Die Ferredoxine 2, 6 und 8 sollten laut Vorhersage je einen [4Fe-4S]-Cluster enthalten, wohingegen die Aminosäuresequenz der Ferredoxine 4 und 7 auf das Vorhandensein von jeweils zwei [4Fe-4S]-Clustern schließen lässt. Ferredoxin 3 schließlich wurde als “Sucrase/Ferredoxin ähnliches” Protein eingestuft. Wie diese Bezeichnung bereits andeutet, handelt es sich dabei um Proteine, die zwar Ferredoxinen ähneln, jedoch eine sucrolytische Aktivität aufweisen und außerdem für gewöhnlich deutlich größer als Ferredoxine sind.

Die translatierten Nukleotidsequenzen wurden außerdem zur Bestimmung des theoretischen Molekulargewichts (MW) und des theoretischen isoelektrischen Punktes (pI) herangezogen (Tabelle 3.1.1). Da es sich bei Ferredoxinen um kleine, saure Proteine handelt (Lovenberg, 1973), sollte das erwartete Molekulargewicht bei etwa 6-14 kD (in manchen Fällen aber auch bis zu 24 kD) und der pI-Wert im sauren Bereich liegen. Dies ist bei der Mehrheit der identifizierten putativen *S. cellulosum* So ce56 Ferredoxine der Fall; die einzigen Ausnahmen bilden Fdx3 und Fdx6. Fdx3, das schon in der „Pfam“-Analyse keine der üblichen Ferredoxin Domänen aufwies, sondern als „Sucrase/Ferredoxin ähnliches“ Protein eingestuft wurde, hat einen für ein Ferredoxin ungewöhnlich hohen pI-Wert von 8,34. Auch Fdx6 liegt mit einem theoretischen pI-Wert von 8,16 deutlich im basischen Bereich und befindet sich außerdem mit einem theoretischen Molekulargewicht von 25,7 kD auch an der oberen Grenze der für Ferredoxine bekannten Größe.

Um weitere Hinweise auf mögliche Funktionen der einzelnen Ferredoxine zu erhalten, wurden die *S. cellulosum* So ce56 Ferredoxine mit der im Methodenteil aufgeführten Auswahl an Ferredoxinen verglichen und in einen distanzbasierten *Neighbour Joining* Stammbaum eingeordnet. Das Dendrogramm (Abbildung 3.1.1.1) zeigt zwei große abgegrenzte Bereiche, die die Ferredoxine nach ihrem Cluster-Typ in die Gruppe der [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine und die Gruppe der Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine unterteilen. In der Gruppe der [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine sind fünf deutlich voneinander abgegrenzte Gruppierungen zu finden: Ferredoxine aus phototrophen Organismen (höhere Pflanzen, Nr.1-3, und Cyanobakterien, Nr. 4 und 5), zwei Gruppen von Ferredoxinen, die eine Rolle in Cytochrom P450 Systemen spielen (bakterielle Pdx-artige Ferredoxine, Nr. 6-9, und Vertebraten-Typ oder Adx-Typ Ferredoxine, Nr. 10 und 11), Ferredoxine, die an der Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern beteiligt sind (isc-Typ Ferredoxine, Nr. 12-15) sowie die Thioredoxin-artigen Ferredoxine (Nr. 16 und 17). Fdx5 ist keiner dieser Gruppen eindeutig zuzuordnen. Fdx1 hingegen gehört zur Gruppe der isc-Typ Ferredoxine und der bakteriellen Pdx-Typ Ferredoxine. Außerdem weist Fdx1 Ähnlichkeit zu einem der 4 putativen Ferredoxine aus *Myxococcus xanthus* (Goldman *et al.*, 2006) auf. Für dieses Ferredoxin (MXAN\_5006; Nr. 18) wurde laut automatischer Annotation eine Beteiligung an der Eisen-Schwefel-Cluster Biogenese vorhergesagt, was eine ähnliche Funktion für Fdx1 impliziert. Diese Annahme erscheint auch mit Hinblick auf die Lage des *fdx1* Gens innerhalb eines putativen *isc* Operons plausibel. Dennoch kann eine Beteiligung von Fdx1 an Klasse I Cytochrom P450 Systemen nicht völlig ausgeschlossen werden, da bekannt ist, dass isc-Typ Ferredoxine starke Ähnlichkeit mit Adx-Typ Ferredoxinen aufweisen wie beispielsweise Yah1 aus *S. cerevisiae*

(Barros und Nobrega, 1999) oder Etp1<sup>fd</sup> aus *S. pombe* (Schiffler *et al.*, 2004a; Ewen *et al.*, 2008).

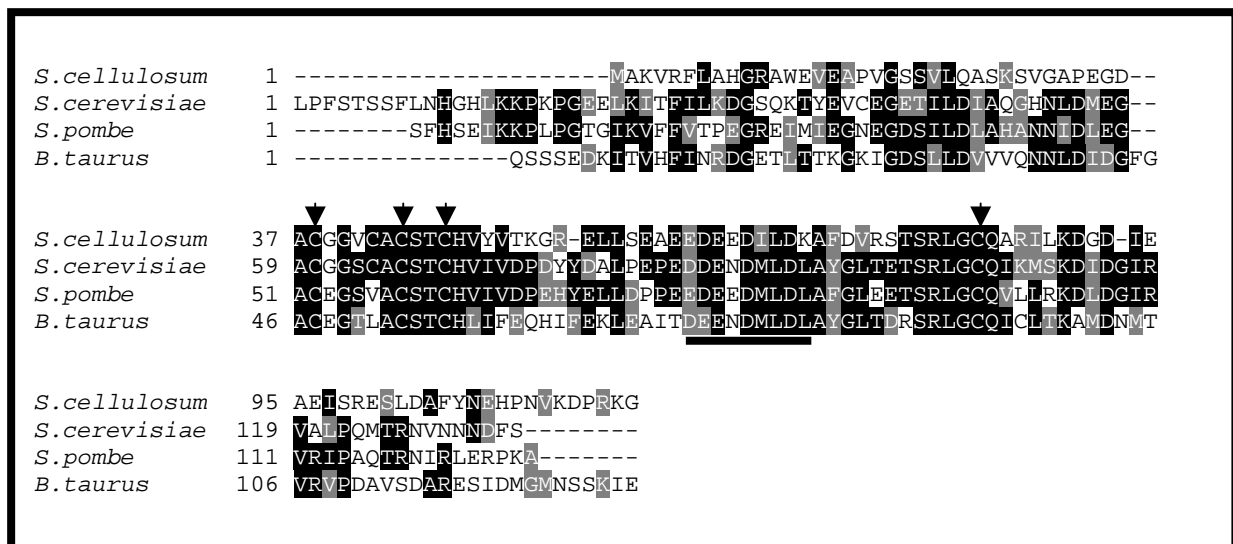


**Abbildung 3.1.1.1: Phylogenetischer Vergleich der *S. cellulosem* So ce56 Ferredoxine mit Ferredoxinen unterschiedlicher Herkunft**

Das Dendrogramm wurde durch Sequenzalignments der Primärsequenz unterschiedlicher Ferredoxine mit „Mega 4.1“ generiert und visualisiert. Es wurden ausschließlich Ferredoxine im engeren Sinne, das heißt kleine Eisen-Schwefel Proteine mit mindestens einem über Cysteinreste koordinierten Eisen-Schwefel-Cluster mit negativem Redoxpotential verwendet. Rubredoxine, Rieske-Proteine und HiPIPs wurden nicht mit einbezogen. Die [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine sind im oberen, hellgrau unterlegten Teil der Abbildung dargestellt und mit arabischen Ziffern abgekürzt, die Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine des Mono- und Dicluster Typs befinden sich im zweiten, dunkler grau unterlegten Teil und sind mit Buchstaben abgekürzt.

Die *S. cellulosem* So ce56 Ferredoxine sind mit Fdx1-8 bezeichnet. Die Proben “18” (MXAN2926) und “19” (MXAN5006) stellen zwei von vier vorhergesagten Ferredoxinen aus dem ersten vollständig sequenzierten Myxobakterium *Myxococcus xanthus* dar (Goldman *et al.*, 2006). In Abbildung 3.1.1.1 sind lediglich MXAN2926 und MXAN5006 aufgeführt, da nur diese beiden *Myxococcus* Ferredoxine Homologe in *S. cellulosem* So ce56 zu haben scheinen. Ferredoxine, für die *in vivo* oder *in vitro* eine Elektronentransportaktivität in Cytochrom P450 Systemen belegt ist, sind durch Sternchen gekennzeichnet.

Ein Alignment von Fdx1, dem Cytochrom P450 System Ferredoxin Adx und den beiden vermutlich in die Eisen-Schwefel-Cluster Biogenese eingebundenen Ferredoxinen Etp1<sup>fd</sup> und Yah1 ist in Abbildung 3.1.1.2 dargestellt. Besonders im mittleren Bereich, in dem sich die für die Koordination des Eisen-Schwefel-Clusters benötigten Cysteinreste befinden, weist die Fdx1 Sequenz deutliche Homologien zu den anderen Ferredoxinen auf. Der Sequenzvergleich deutet darauf hin, dass von den fünf in Fdx1 vorkommenden Cysteinresten die Reste C38, C44, C47 und C83 das Erkennungsmotiv bilden und den Eisen-Schwefel-Cluster binden. Außerdem fällt auf, dass auch die Region, die der primären Interaktionsdomäne des Adx (Aminosäurereste 68-86, besonders D76 und 79 sowie D72 und E73 des Adx (Coghlan und Vickery, 1991; Heinz *et al.*, 2005)) entspricht, recht stark konserviert ist.



**Abbildung 3.1.1.2: Alignment der Primärsequenzen der mitochondrialen Ferredoxine aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Bos taurus* mit dem *Sorangium cellulosum* So ce56 Ferredoxin Fdx1**

Das gezeigte Alignment wurde mit den Programmen „ClustaW“ und „Boxshade“ generiert. Identische Aminosäurereste sind schwarz unterlegt, konservierte Reste grau. Bei den mitochondrialen Ferredoxinen wurden die maturaen Sequenzen verwendet (Schiffler *et al.*, 2004a). Die saure, primäre Interaktionsdomäne des Adx ist durch einen Balken markiert, konservierte Cysteinreste durch Pfeile.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der „Pfam“-Analyse ist Fdx3 im Dendrogramm (Abbildung 3.1.1.1) deutlich von den klassischen [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen abgegrenzt. Allerdings bildet dieses Ferredoxin zusammen mit einem *Myxococcus xanthus* Ferredoxin unbekannter Funktion (MXAN\_2926; Nr.19) eine Gruppe, der auch die Thioredoxin-Typ

Ferredoxine aus *Clostridium pasteurianum* und *Azotobacter vinelandii* (Meyer, 2001) zugeordnet sind. Von den beiden letzteren nimmt man an, dass sie eine Rolle bei der Stickstofffixierung spielen, aber bislang gibt es keine Hinweise darauf, dass Myxobakterien im Allgemeinen und *S. cellulosum* So ce56 im Besonderen in der Lage sind, diese Reaktion durchzuführen.

Betrachtet man die Gruppe der Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine in Abbildung 3.1.1.1, zeigt sich, dass keine derart klar definierten Gruppen wie bei den [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen zu finden sind. Die 7Fe Dicluster-Typ Ferredoxine unterteilen sich in zwei Gruppen, die jeweils aber auch Monocluster-Typ Ferredoxine enthalten: der eine Ast enthält die 7Fe Ferredoxine a, b, und j aus *Streptomyces coelicolor* sowie die putativen myxobakteriellen Monocluster-Typ Ferredoxine Fdx2 und Fdx8, der andere die *Streptomyces* 7Fe Ferredoxine c, d und e und die übrigen Monocluster-Typ Ferredoxine. Die übrigen *S. cellulosum* So ce56 Ferredoxine können keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden, obwohl zumindest Fdx6 und Fdx7 entfernt verwandt zu sein scheinen.

Im Hinblick auf die Suche nach potentiellen Interaktionspartnern von Cytochrom P450 Systemen wurden die Ferredoxine, von denen bekannt ist, dass sie *in vivo* oder *in vitro* Elektronen an Cytochrome P450 liefern können, in Abbildung 3.1.1.1 durch Sternchen markiert. Es fällt auf, dass unter den [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen nicht nur die mit Klasse I Cytochrom P450 Systemen assoziierten Pdx- und Adx-Typ Ferredoxine als Elektronendonoren für Cytochrome P450 dienen können, sondern auch die physiologisch in einen vollkommen anderen Prozess involvierten Ferredoxine aus photosynthetisch aktiven Organismen (Hannemann *et al.*, 2007). Betrachtet man die Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine, so ist von den Ferredoxinen a, b, d und f bekannt, dass sie an CYP105D5 binden, obwohl ein effizienter Elektronentransfer nur für Ferredoxin d gezeigt werden konnte (Lei *et al.*, 2004; Chun *et al.*, 2007). Auch Fdx i und j aus *Streptomyces griseus* (Trower *et al.*, 1990b; Trower *et al.*, 1992) sowie die Ferredoxine g, h und k aus *Mycobacterium tuberculosis* (McLean *et al.*, 2006), *Bacillus subtilis* (Green *et al.*, 2003) bzw. *Mycobacterium sp. HE5* (Sielaff *et al.*, 2001) zeigen Aktivität in Cytochrome P450 Systemen.

**Tabelle 3.1.1: Bioinformatische Untersuchung der Ferredoxine aus *S. cellulorum* So ce56**

Gen	Genprodukt annotiert als	Protein Name	UniProt Eintrag	Aminosäuren	Theoret. MW [kD]	Theoret. pI	Pfam Eintrag (Aminosäureposition)
sce7334	Putatives 2Fe-2S Ferredoxin	Fdx1	A9EY18	118	12,8	4,94	Fer2 (6-89)
sce8005	Hypothetisches Protein	Fdx2	A9FH21	101	11,2	4,29	Fer4 (2-25)
sce9225	Hypothetisches Protein	Fdx3	A9GDT7	127	13,6	8,34	Sucrase/Ferredoxin-like (71-102)
sce3039	Hypothetisches Protein	Fdx4	A9GFT9	111	11,9	4,62	Fer4 (3-26), Fer4 (34-57)
sce7304	Putatives Ferredoxin	Fdx5	A9EXQ0	103	10,9	5,47	Fer2 (5-88)
sce5732	Putatives uncharakterisiertes Protein	Fdx6	A9G7R4	241	25,7	8,16	Fer4 (155-180)
sce2755	Putatives Ferredoxin fdxE	Fdx7	A9GAV0	94	10,4	5,61	Fer4 (31-55), Fer4 (63-86)
sce5549	Ferredoxin/Ferredoxin NADP Reduktase	Fdx8	A9G317	107	11,9	4,32	Fer4 (52-75)

### 3.1.2. Untersuchung der *Sorangium cellulosum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen

#### Umgebung der Ferredoxin Reduktasegene

Um Hinweise auf die Funktionen der putativen *S. cellulosum* So ce56-Ferredoxinreduktasen zu erhalten, wurde die Umgebung der Reduktasegene ebenfalls näher betrachtet. Das *fdRA* Gen *sce7188* ist in der NCBI Datenbank als Ferredoxin NADP<sup>+</sup> Reduktase Gen annotiert und ist nicht Teil eines Operons, da die angrenzenden Gene gegenläufig zu *sce7188* angeordnet sind. Auch das *fdRB* Gen *sce5135*, dessen Produkt als Protein mit einer Oxidoreduktase FAD-Bindedomäne annotiert ist, kann keinem Operon zugeordnet werden, da es von seinen Nachbargenen durch relativ lange nichtkodierende DNA-Bereiche (200 bp zwischen *sce5134* und *sce5135* sowie 1321 bp zwischen *sce5135* und *sce5136*) getrennt ist.

#### Untersuchung der abgeleiteten Proteinprimärstruktur der *Sorangium cellulosum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen

Die von der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz der Ferredoxin Reduktasen *FdRA* und *FdRB* wurde mit Hilfe der „Pfam“-Datenbank auf das Vorhandensein konservierter Domänen untersucht. Bei beiden Proteinen wurde eine FAD-Bindedomäne im N-terminalen Bereich sowie eine NADH-Bindedomäne im C-terminalen Bereich identifiziert (siehe Tabelle 3.1.2 und Abbildung 3.1.4). Diese Zweidomänenstruktur mit einer Flavin-Bindedomäne und einer NAD(P)H-Bindedomäne ist typisch für Ferredoxin Reduktasen, kommt aber auch bei einer Reihe anderer Flavoproteine vor. Betrachtet man das theoretische Molekulargewicht der putativen *Sorangium cellulosum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen, so liegen *FdRA* mit 30,5 kD und *FdRB* mit 26,7 kD beide in dem für Ferredoxin Reduktasen typischen Bereich von 25-50 kD, wobei beide hinsichtlich ihrer molekularen Masse mehr den Ferredoxin Reduktasen aus *E. coli* (27,6 kD, (Bianchi *et al.*, 1993)) oder Spinat (35,3 kD, (Karplus *et al.*, 1984)) ähneln als den Cytochrom P450 System assoziierten Ferredoxin Reduktasen aus *Pseudomonas putida* (45,6 kD (Sevrioukova und Poulos, 2002)), *Mycobacterium tuberculosis* (49,3 kD, (McLean *et al.*, 2003)) oder dem Rind (50,3 kD (Sagara *et al.*, 1993)). Der theoretische pI von 6,01 für *FdRA* und 7,96 für *FdRB* ist ähnlich wie der pI anderer Ferredoxin Reduktasen wie beispielsweise *AdR* (ca. 7 (Ziegler *et al.*, 1999)).

Nach Dym und Eisenberg (Dym und Eisenberg, 2001) kann man die einfachen, FAD-bindenden Proteine in vier Strukturfamilien unterteilen. Eine dieser vier Familien, die Ferredoxin Reduktase Familie, weist die Aminosäuresequenz RxYS(T) als am stärksten



konserviertes Motiv auf. Diese Sequenz tritt auch bei FdRA und FdRB auf (Abbildung 3.1.4), weswegen beide Proteine als Ferredoxin Reduktasen klassifiziert wurden.

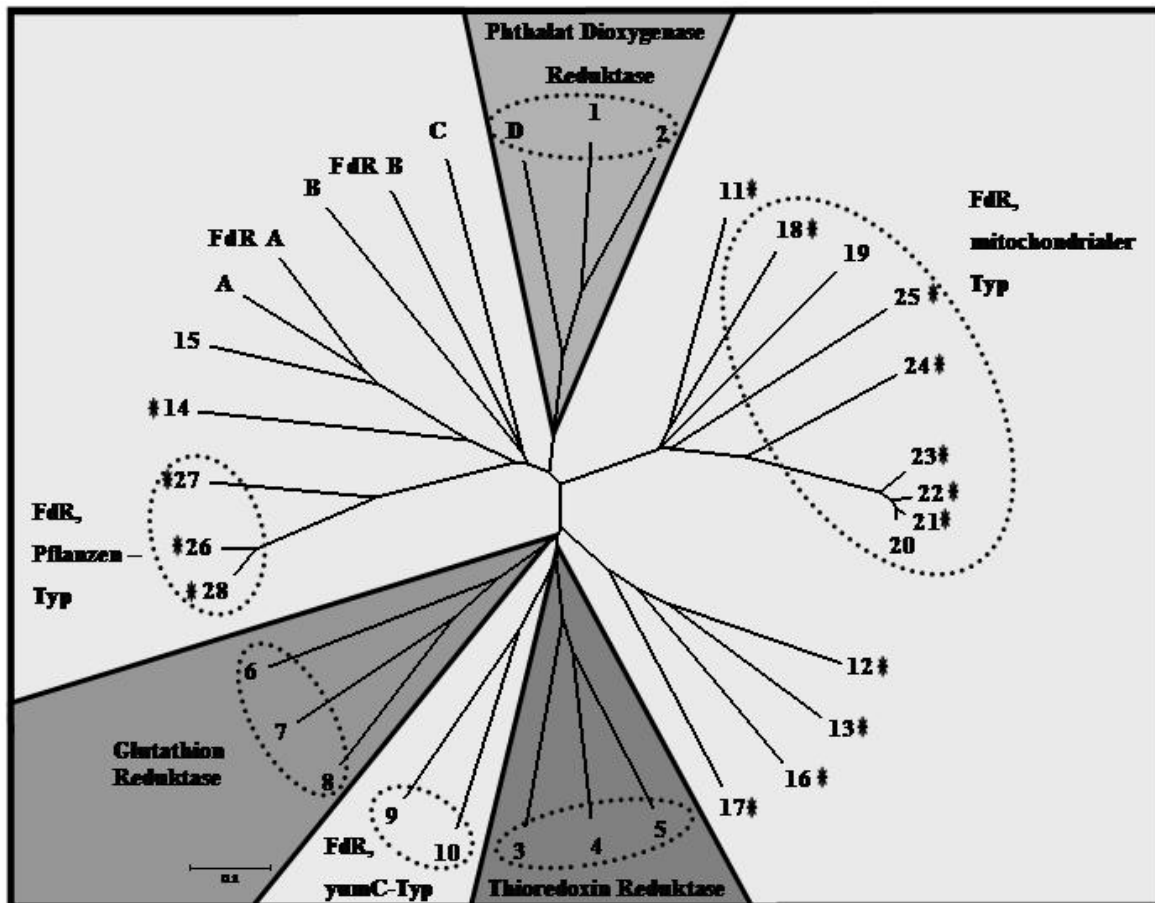
<p><b>FdRA</b></p> <p>MVPGYTEETVLEVVHHWTDKLF<sup>▼</sup>TLK<sup>▼</sup>TTRSPSFRFANGQFCMMGLVVAGKPLV<sup>▼</sup>RAYSLASA  <u>NHEETLEFFSIKVPNGPLTSRLQHI</u>AVGETILVGK<sup>▼</sup>RATGTLTIGNLRPGRTL<sup>▼</sup>WLLATGTGLAPF  <i>LSVVKDPETYERFERVVITHTCRRVQDLAYARYLEHELA</i>AEDELLGEIVRPKLRYYPSVTREAFKTE  GRITALLESGRIFADLALPALDPAH<sup>▼</sup>DRML<sup>▼</sup>LCGSSEMLADTAALLEARGFEEGNSGEPGDYLVK  AFAGEKRSPLASASPAESTNLSGPA</p> <p><b>FDRB</b></p> <p>MIQAEPFEARLVAVRPLSPFVRELSFERADGKAFLFEAGQWVNLVLP<sup>▼</sup>PGGEV<sup>▼</sup>KRAYSIAS  <u>APDGSPRFDLAVTRVEGGAGSEYLHRLEPGATLRAV</u>GPHGLFTRDPGSPAPSLFVATGTGVT  <i>PLRSMRLASLRAGAAHLWILFGARFEEDIIYRDELEALARGSDRIRYEITLSRGGPSWSGRRGYV</i>  QAHVPELYRELAGASGDPAPHV<sup>▼</sup>FICGLDRMVSLVRELARGE<sup>▼</sup>LGVPRKHVHVERYD</p>
--

**Abbildung 3.1.4: Primärsequenz von FdRA und FdRB**

Die durch eine Analyse der Proteindomänen mit der „Pfam“-Datenbank bestimmten Regionen für die Bindung von FAD bzw. NAD(P)H sind unterstrichen bzw. kursiv dargestellt. Aminosäurereste, die zum konservierten Sequenzmotiv der Ferredoxin Reduktase Familie gehören, sind fett geschrieben und durch Pfeile markiert.

Um weitere Hinweise auf die Struktur sowie mögliche Funktionen der beiden *Sorangium cellulosum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen zu erhalten, wurden ihre Aminosäuresequenzen mit denen der im Methodenteil aufgelisteten Flavoproteine (Tabelle 2.2.1) verglichen. Die Sequenzen wurden mit dem Programm „Mega4.1“ aliniert und ein distanzbasierter *Neighbour Joining* Stammbaum wurde konstruiert (Abbildung 3.1.5). Die für die phylogenetische Analyse verwendeten Sequenzen umfassen Phthalat Dioxygenase Reduktasen (Nr. 1 und 2), Thioredoxin Reduktasen (Nr. 3-5), Glutathion Reduktasen (Nr. 6-8) sowie verschiedene Ferredoxin Reduktasen. Der mitochondriale Typ (oder AdR-Typ) der Ferredoxin Reduktasen umfasst die stark konservierten adrenalen Ferredoxin Reduktasen aus Säugetieren (Nr. 20-23) sowie deren Homologe aus anderen Eukaryoten (Nr. 24 und 25), aber auch Prokaryoten (Nr. 11, 18 und 19). Für die Mehrzahl dieser Proteine wurde eine Funktion in Klasse I Cytochrom P450 Systemen nachgewiesen. Einen weiteren Ast bilden bakterielle, Cytochrom P450 assoziierte Ferredoxin Reduktasen aus Actinomyceten (Nr. 12, 13 und 17), die Ähnlichkeiten zur Putidaredoxin Reduktase (PdR, Nr.16) zeigen. Der yumC-Typ der Ferredoxin Reduktasen (Seo *et al.*, 2004) wird durch zwei Sequenzen aus *Bacillus* vertreten (Nr. 9 und 10) und zeigt, wie in der Literatur beschrieben (Seo *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2008), Ähnlichkeiten zu den

Thioredoxin Reduktasen; außerdem treten diese Flavoproteine als Homodimere auf. Deutlich abgegrenzt von den bislang beschriebenen Gruppen sind die Pflanzen-Typ Ferredoxin Reduktasen, vertreten durch zwei Beispielsequenzen aus höheren Pflanzen (Nr. 26 und 28) und eine aus *Anabaena* (Nr.27). Obwohl diese Ferredoxin Reduktasen physiologisch als Elektronenüberträger in der Photosynthese wirken, können sie auch Elektronen von NADPH auf Ferredoxine übertragen und damit zur Rekonstitution von Cytochrom P450 Systemen genutzt werden (Faro *et al.*, 2003; Ogura *et al.*, 2004; Sawada *et al.*, 2004; Gonip *et al.*, 2009) (siehe auch die Übersichtsarbeit von Hannemann, 2007 (Hannemann *et al.*, 2007)). Weiterhin wurden die Sequenzen von vier hypothetischen Flavoproteinen aus *Myxococcus xanthus* (A-D) bei der Erstellung dieses Stammbaumes berücksichtigt. Dabei handelt es sich um drei putative Ferredoxin Reduktasen (A-C) sowie eine Phthalat Dioxygenase Reduktase (D). Betrachtet man die Position der beiden Ferredoxin Reduktasen aus *Sorangium cellulosum* So ce56 so fällt auf, dass beide enger mit den Pflanzen-Typ Ferredoxin Reduktasen verwandt sind als mit den PdR- oder AdR-Typ Ferredoxin Reduktasen. FdRA zeigt allerdings noch einen höheren Verwandtschaftsgrad zu den bakteriellen Ferredoxin Reduktasen aus *Escherichia coli* (Nr.14) und *Azotobacter vinelandii* (Nr.15), besonders aber zu der Ferredoxin Reduktase A (MXAN\_5449) aus *Myxococcus xanthus*. FdRB bildet einen eigenständigen Ast mit den beiden anderen *Myxococcus xanthus* Ferredoxin Reduktasen, wobei in diesem Fall keine so starke Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen besteht, wie das bei FdRA und MXAN\_5449 der Fall ist.



**Abbildung 3.1.5: Phylogenetischer Vergleich der *S. cellulorum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen mit ähnlich aufgebauten Monoflavin Reduktasen unterschiedlicher Herkunft**

Das Dendrogramm wurde durch Sequenzalignments der Aminosäuresequenz unterschiedlicher Vertreter verschiedener Flavoproteingruppen mit „Mega 4.1“ generiert und visualisiert. Es wurde eine Auswahl von Flavoproteinen mit einer Zweidomänenstruktur verwendet, die über eine NAD(P)H-Bindedomäne und eine Flavin-Bindedomäne verfügen; die Phthalat Dioxygenase Reduktasen verfügen als komplexe Flavinenzyme darüber hinaus noch über ein Eisen-Schwefel Zentrum. Die Ferredoxin Reduktasen sind im hellgrau unterlegten Teil der Abbildung dargestellt, Glutathion Reduktasen, Thioredoxin Reduktasen und Phthalat Dioxygenase Reduktasen sind in dunkleren Grautönen unterlegt. Vertreter dieser vier Gruppen sind mit arabischen Ziffern gekennzeichnet. Die *S. cellulorum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen hingegen sind mit FdRA und FdRB bezeichnet. Vier weitere mit A-D abgekürzte Sequenzen wurden ebenfalls zur Konstruktion des Stammbaumes herangezogen; diese stellen putative Flavoproteine aus *Myxococcus xanthus* dar, die Sequenzhomologien zu FdRA und/oder FdRB aufweisen. Ferredoxin Reduktasen, für die *in vivo* oder *in vitro* eine Elektronentransportaktivität in Cytochrom P450 Systemen belegt ist, sind durch Sternchen gekennzeichnet.

**Tabelle 3.1.2: Bioinformatische Untersuchung der Ferredoxin Reduktasen aus *S. cellulorum* So ce56**

Gen	Genprodukt annotiert als	Protein Name	UniProt Eintrag	Aminosäuren	Theoret. MW [kD]	Theoret. pI	Pfam Eintrag (Aminosäureposition)
sce7188	Ferredoxin NADP <sup>+</sup> Reduktase	FdRA	A9ES55	278	30,5	6,01	FAD_binding_6 (7-97) NAD_binding_1 (112-231)
sce5135	Oxidoreduktase; Untereinheit zur FAD-Bindung	FdRB	A9FRJ0	244	26,7	7,96	FAD_binding_6 (8-104) FAD_binding_9 (10-103) NAD_binding_1 (114-225)

### 3.2. Expressionsstrategie und Reinigung

Da es nicht möglich war, anhand der bioinformatischen Untersuchungen die potentiellen Elektronentransferproteine der myxobakteriellen Cytochrom P450 Systeme mit genügender Sicherheit zu bestimmen, sollten die infrage kommenden Gene in *E. coli* Expressionsvektoren kloniert und die entsprechenden Proteine überexprimiert und gereinigt werden. Um die Reinigung zu erleichtern, sollten die Proteine nach Möglichkeit mit einem „tag“ exprimiert werden. Hierzu wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt: Entweder wurde das Gen während der PCR um eine Sequenz erweitert, die einen C-terminalen *His<sub>6</sub>-tag* kodiert und im Vektor pKKHC exprimiert oder das Gen (ohne die zusätzlichen Histidin Codons) wurde in den Vektor pGEX6P1\_nco ligiert, in dem es *in-frame* unmittelbar hinter dem Glutathion-S-Transferase (GST) Gen liegt und somit mit einem N-terminalen *GST-tag* exprimiert werden kann. Für den Fall, dass die *tags* die Proteinexpression negativ beeinflussen sollten, wurden außerdem pKKHC Expressionsvektoren hergestellt, die das Gen ohne die für den C-terminalen *His<sub>6</sub>-tag* kodierende Sequenz enthielten.

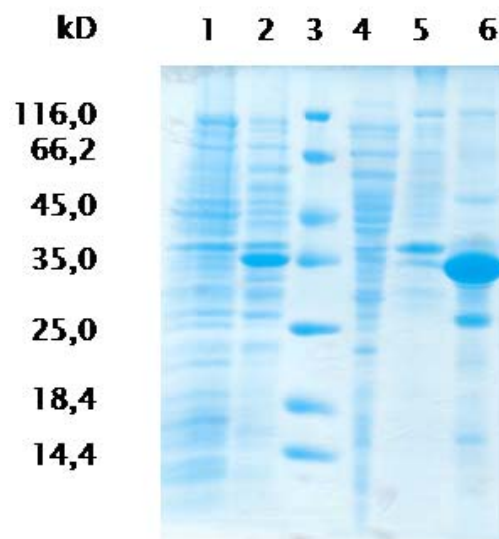
Für alle Proteine wurden unterschiedliche Expressionsbedingungen getestet, bei denen Parameter wie Expressionsstamm, Expressionsplasmid, Kulturgefäß, Expressionsdauer, Temperatur und Schüttelgeschwindigkeit variiert wurden. Als Expressionsstamm wurde zunächst BL21 verwendet, der sich aufgrund seiner *lon* und *ompT* Proteasedefizienz als genereller Expressionsstamm eignet. Da wegen des für Myxobakterien typischen hohen GC-Gehaltes innerhalb der Gene oftmals von *E. coli* selten genutzte Codons auftreten, wurden auch die zwei von BL21 abgeleiteten, aber mit zusätzlichen tRNAs für die seltenen Codons ausgestatteten Stämme BL21(DE3)CodonPlus-RIL (mit tRNAs für AGG, AGA, AUA, CUA) und Rosetta(DE3)pLysS (mit tRNAs für AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA) getestet. Im Vergleich zu BL21 wachsen beide Stämme jedoch relativ langsam und weisen darüber hinaus auch eine niedrigere Transformationseffizienz auf. Deswegen wurde, wenn möglich, der schnellwachsende Stamm BL21 für die Expression verwendet. Für jedes Protein wurde die Expression mit unterschiedlichen Plasmiden für die Formen mit *His<sub>6</sub>-tag*, *GST-tag* sowie ohne *tag* untersucht, wobei bei erfolgreicher Expression den *getaggten* Formen aufgrund der schnelleren Reinigungsprozedur der Vorzug gegeben wurde. Als Kulturgefäße für die Expression wurden Erlenmeyerkolben oder Fernbachkolben verwendet. Besonders im Fall von Fdx1 konnte festgestellt werden, dass die Sauerstoffzufuhr, die über Form und Füllhöhe des Kulturgefäßes sowie über die Schüttelgeschwindigkeit und die Verwendung von Gefäßen

mit Schikanen beeinflusst wurde, von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Expression war. Auch die Expressionsdauer sowie die Temperatur wurde bei Bedarf variiert, wobei eine niedrigere Expressionstemperatur normalerweise mit einer niedrigeren Proteinexpression einherging, weswegen sie in der Regel mit einer längeren Expressionszeit gekoppelt wurde. Im Gegensatz zu AdR oder *S. pombe* Arh1, die bei 30°C exprimiert werden (Sagara *et al.*, 1993; Ewen *et al.*, 2008), zeigte sich bei den myxobakteriellen Reduktasen, dass eine Expression bei 37°C in relativ kurzer Zeit (24-48 h) möglich ist. Bei den Ferredoxinen wurde eine Verringerung der Temperatur getestet, wenn Probleme hinsichtlich der Löslichkeit auftraten (siehe Fdx7). Insgesamt konnten so für sechs der acht Ferredoxine sowie für beide Ferredoxin Reduktasen Bedingungen für die Expression in löslicher Form in *E. coli* etabliert werden (Tabelle 3.2.1).

Die Ferredoxine konnten im Expressionsstamm *E. coli* BL21 gebildet werden, bei den größeren Ferredoxin Reduktasen wurde der *codon-usage* optimierte Stamm Rosetta (DE3)pLysS verwendet, wobei sich die FdRBhis allerdings auch in BL21 exprimieren lässt. Die Ferredoxine Fdx2, Fdx3, Fdx5, Fdx6 und Fdx8 sowie die beiden Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRA konnten erfolgreich mit *His<sub>6</sub>-tag* exprimiert werden, das Ferredoxin Fdx1 ließ sich nur mit *GST-tag* in löslicher Form bilden (Tabelle 3.2.1). Auch FdRB konnte mit *GST-tag* exprimiert werden (48 h, 25°C in Fernbachkolben unter starkem Schütteln), jedoch wurde bei diesem Protein aus Effizienz- und Kostengründen ebenfalls lediglich die *His<sub>6</sub>-getaggte* Variante für die nachfolgenden Messungen verwendet. Dadurch konnte auf die notwendige Abspaltung des *GST-tags* nach der Reinigung verzichtet werden, welcher aufgrund seiner Größe von 26 kD (ca. doppelt so groß wie ein Ferredoxin und genauso groß wie die Ferredoxin Reduktase) die biochemischen Analysen und Messungen beeinflussen und damit zu falschen Ergebnissen führen könnte.

Das Ferredoxin Fdx4 konnte nicht exprimiert werden; die heterologe Expression von Fdx7 gelang nur in der *GST-getagkten* Form. Mit BL21 als Expressionsstamm konnte nach 24 h Expression bei 37°C eine starke Expression im SDS-Gel nachgewiesen werden; allerdings befand sich das Protein nach Zellyse und Ultrazentrifugation nicht wie erwartet im Überstand (d.h. der cytosolischen Fraktion, siehe Abbildung 3.2.1) sondern im Zellpellet. Um bestimmen zu können, ob sich das Protein in der Membranfraktion befindet oder aber unlöslich in Form von Einschlusskörpern vorliegt, wurde zu dem Pellet Triton X-100 (solubilisiert Membranproteine) bzw. 8 M Harnstoff (solubilisiert Einschlusskörper) hinzugegeben. Dabei zeigte sich, dass das *GST-getaggte* Fdx7 mit einem theoretischen Molekulargewicht von 36,4 kD in Form von Einschlusskörpern vorliegt (Abbildung 3.2.1).

Dies ist besonders überraschend, da der *GST-tag* dafür bekannt ist, dass er die Löslichkeit des fusionierten Proteins steigern kann (Amersham Biosciences). Auch Modifikationen der Expressionsbedingungen führten nicht zur Produktion von Fdx7 in löslicher Form. Das Absenken der Expressionstemperatur auf 30°C bzw. 23°C resultierte in einer verminderten Expression, nicht aber in einer ausreichend großen Ausbeute an löslichem Protein. Die Koexpression der *E. coli* HSP70-Proteine DnaK, DnaJ und GrpE mit Hilfe des Expressionsplasmids pRDKJG bzw. der *E. coli* HSP60-Chaperone GroEL und GroES mit Hilfe des Expressionsplasmids pREP4-groESL (Caspers *et al.*, 1994) führte ebenso wenig zum Erfolg wie die Induktion der endogenen *E. coli* Chaperone durch Zugabe von Ethanol in unterschiedlichen Konzentrationen von 2% bis 6% (Thomas und Baneyx, 1997). Die Herabsetzung der Expressionstemperatur wurde auch in Kombination mit der Chaperon-Koexpression getestet, ebenso wie eine Expression für 24 h bzw. 48 h bei 10°C mit dem kälteoptimierten Expressionsstamm ArcticExpress RP (Stratagene), der sowohl über einen optimierten Codongebrauch als auch über zusätzliche Chaperone (Cpn60 und Cpn10 aus dem psychrophilen Bakterium *Oleispira antarctica*) verfügt.



**Abbildung 3.2.1: Heterologe Expression von Fdx7 in *E. coli* BL21 und Anreicherung der Einschlusskörper**

1: BL21 mit pGEX6P1\_nco Fdx7, vor Induktion; 2: BL21 mit pGEX6P1\_nco Fdx7, 24 h nach Induktion (37°C); 3: peqGOLD Protein-Marker I (peqLab); 4: Überstand nach Aufschluss und Ultrazentrifugation; 5: Überstand nach Detergenzbehandlung (Triton X-100) und Zentrifugation; 6: Einschlusskörper nach Harnstoffbehandlung (8 M Harnstoff)

**Tabelle 3.2.1: Bedingungen für die heterologe Expression der in löslicher Form exprimierten *Sorangium cellulosum* So ce56 Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen in *E. coli*.**

Aufgeführt sind die Bedingungen, die die höchste Ausbeute an löslichem, reinem Protein erbrachten.

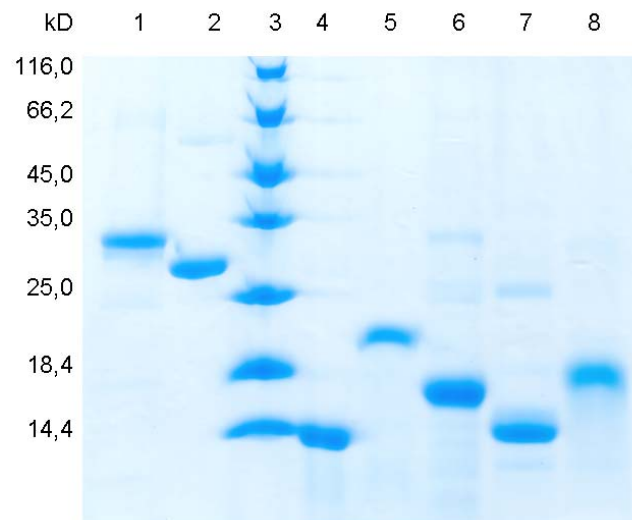
Protein	Expres-sions-plasmid	<i>E. coli</i> Expressions-stamm	Antibiotikum	Kulturgefäß	Kultur-volumen	Expres-sionszeit [h]	Expres-sions-temperatur [°C]	Schüttel-geschwindig-keit [UpM]
Fdx1	pGEX6P1_nco	BL21	100 µg/ml Ampicillin	1 l Fernbach-kolben mit Schikanen	350 ml	48	25	250
Fdx2his	pKKHC	BL21	100 µg/ml Ampicillin	2 l Erlenmeyer-kolben	1 l	24	37	180
Fdx3his	pKKHC	BL21	100 µg/ml Ampicillin	2 l Erlenmeyer-kolben	1 l	48	37	180
Fdx5his	pKKHC	BL21	100 µg/ml Ampicillin	2 l Erlenmeyer-kolben	1 l	48	37	180
Fd6his	pKKHC	BL21	100 µg/ml Ampicillin	2 l Erlenmeyer-kolben	1 l	24	37	180
Fdx8his	pKKHC	BL21	100 µg/ml Ampicillin	2 l Erlenmeyer-kolben	1 l	24	37	180
FdRAhis	pKKHC	Rosetta (DE3)pLysS	100 µg/ml Ampicillin 50 µg/l Chloramphenicol	2 l Erlenmeyer-kolben	1 l	24	37	180
FdRBhis	pKKHC	Rosetta (DE3)pLysS	100 µg/ml Ampicillin 50 µg/l Chloramphenicol	2 l Erlenmeyer-kolben	1 l	48	37	180



Fdx6 hingegen konnte mit *His<sub>6</sub>-tag* in löslicher Form gebildet werden. Jedoch traten während der Reinigung Probleme auf, da sich dieses Protein als sehr instabil erwies. Nach dem ersten Reinigungsschritt (IMAC) sollte das dunkelbraun-grünlich gefärbte Fdx6 als Vorbereitung für die Gelfiltrationschromatographie konzentriert werden. Allerdings zeigte sich, dass Fdx6 bereits während dieses Prozesses bzw. während der Lagerung der Proben auf Eis (je nach Elutionsvolumen ca. 1-2 h) ein dunkelbraunes Präzipitat bildete. Auch die Verwendung von Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten, Salzkonzentrationen sowie stabilisierenden Zusätzen (Glycerol, Saccharose, Arginin (Arakawa *et al.*, 2007)) konnten das potentielle Ferredoxin nicht über einen längeren Zeitraum stabilisieren. Am effektivsten erwies sich der Zusatz von 400 mM Arginin, wodurch das teilweise gereinigte Fdx6 für einige Stunden stabilisiert werden konnte. Bei längerer Lagerung (z.B. 4°C bzw. auf Eis über Nacht) oder nach Einfrieren und Auftauen der Probe trat jedoch wieder das Präzipitat auf. Aufgrund der mangelnden Stabilität dieses Proteins sowie seiner eher Ferredoxin-untypischen theoretischen Eigenschaften wurde Fdx6 daher nicht weiter untersucht.

Die übrigen fünf löslich exprimierten Ferredoxine (Fdx1, 2, 3, 5 und 8) sowie die beiden Ferredoxin Reduktasen konnten gereinigt werden (siehe 2.2.3.), wobei die Reinheit der myxobakteriellen Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen sowohl mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 3.2.2) als auch durch die Q-Wert Berechnung (Tabelle 3.2.2) gezeigt werden konnte.

In der SDS-PAGE wandern die Ferredoxin Reduktasen zwischen den Markerbanden von 25,0 kD und 35,0 kD, wobei sich die FdRA Bande etwas höher als die FdRB Bande befindet. Dies stimmt mit den theoretisch zu erwartenden Größen von 30,5 kD (mit *tag*: 31,3 kD) für FdRA und 26,7 kD (mit *tag*: 27,5 kD) für FdRB überein. Auch die Ferredoxine Fdx1 (theoretische molekulare Masse: 12,8 kD), Fdx3 (theoretische molekulare Masse: 13,6 kD; mit *tag*: 14,4 kD) und Fdx5 (theoretische molekulare Masse: 10,9 kD, mit *tag*: 11,7 kD) stimmen mit den berechneten Werten mit geringen Abweichungen überein. Auffällig hingegen ist die Abweichung der molekularen Massen von Fdx2 und Fdx8, die eine Größe/molekulare Masse von etwa 24 kD und 19 kD statt der erwarteten 11,2 kD (mit *tag*: 12,0 kD) und 11,9 kD (mit *tag*: 12,7 kD) in der SDS-PAGE besitzen. Allerdings ist auch für andere Ferredoxine bereits ein vom theoretisch errechneten Wert abweichendes Laufverhalten in der SDS-PAGE beschrieben worden (Fujinaga und Meyer, 1993; Schiffler *et al.*, 2004a).



**Abbildung 3.2.2: SDS-PAGE (15%) der gereinigten *Sorangium cellulosum* So ce56 Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen.**

1: FDRA; 2: FdRB; 3: peqGOLD Protein-Marker I (peqLab); 4:Fdx1 (ohne GST); 5: Fdx2; 6: Fdx 3; 7: Fdx 5; 8: Fdx 8

Die Gesamtproteinkonzentration der gereinigten Proben wurde mit Hilfe des BC Assays bestimmt. Unter der Voraussetzung, dass die Gesamtproteinkonzentration der gereinigten Probe der Konzentration des jeweiligen myxobakteriellen Proteins entspricht, wurde mit Hilfe des theoretischen Molekulargewichtes der molare Extinktionskoeffizient für eine Wellenlänge bestimmt, bei der das jeweilige Protein ein typisches, auf die prosthetische Gruppe und ihre Umgebung im Protein zurückzuführendes Absorptionsmaximum aufweist. Außerdem wurde die durch das Vorhandensein aromatischer Aminosäuren bedingte allgemeine Proteinabsorption bei 276 nm in Relation zu dem jeweiligen spezifischen Maximum gesetzt, um über den so ermittelten Q-Wert ein Indiz für den Reinheitsgrad zu erhalten. Die Proteinausbeuten, die molaren Extinktionskoeffizienten sowie die Q-Werte der einzelnen Proteine sind in Tabelle 3.2.2 aufgeführt.

**Tabelle 3.2.2: Ertrag und spektrale Eigenschaften der Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen aus *S. cellulosum* So ce56**

Die Abkürzung “n.b.” (nicht bestimmbar) weist darauf hin, dass experimentelle Daten aufgrund fehlender Expression (Fdx4), Instabilität (Fdx6) oder Unlöslichkeit (Fdx7) des entsprechenden Proteins nicht vorliegen.

Protein	Ertrag [nmol Protein/l Kultur]	Molarer Extinktions- koeffizient [l · mol <sup>-1</sup> · cm <sup>-1</sup> ]	Q-Wert
Fdx1	> 600	$\epsilon_{411\text{nm}} = 8320$	$A_{411\text{nm}}/A_{276\text{nm}} = 0,4 - 0,5$
Fdx2	>350	$\epsilon_{390\text{nm}} = 6181$	$A_{390\text{nm}}/A_{276\text{nm}} = 0,5 - 0,6$
Fdx3	>750	$\epsilon_{462\text{nm}} = 6589$	$A_{462\text{nm}}/A_{276\text{nm}} = 0,5 - 0,6$
Fdx4	n.b.	n.b.	n.b.
Fdx5	400	$\epsilon_{418\text{nm}} = 11704$	$A_{418\text{nm}}/A_{276\text{nm}} = 0,7 - 0,8$
Fdx6	n.b.	n.b.	n.b.
Fdx7	n.b.	n.b.	n.b.
Fdx8	>250	$\epsilon_{400\text{nm}} = 9700$	$A_{418\text{nm}}/A_{276\text{nm}} = 0,5 - 0,6$
FdRA	400	$\epsilon_{448\text{nm}} = 8760$	$A_{276\text{nm}}/A_{448\text{nm}} = 5,5 - 6,0$
FdRB	400	$\epsilon_{457\text{nm}} = 8730$	$A_{276\text{nm}}/A_{457\text{nm}} = 5,5 - 6,0$

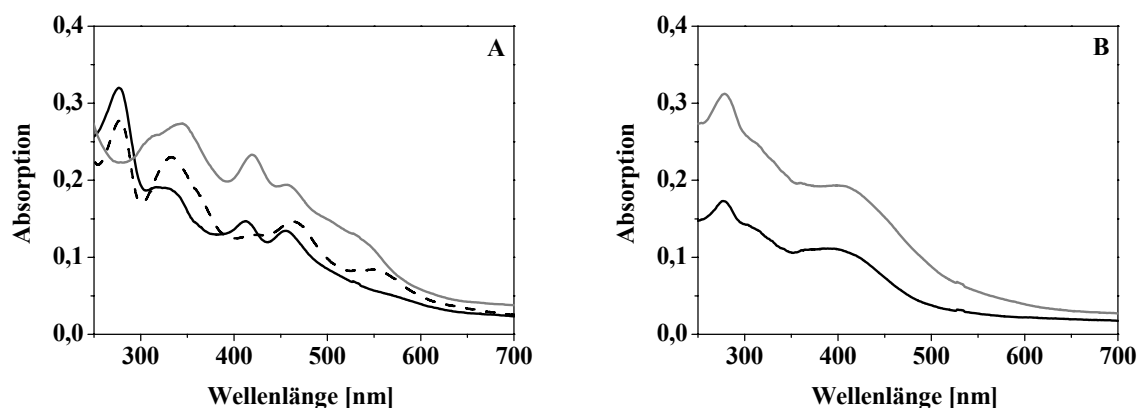
### 3.3. Charakterisierung der Ferredoxine aus *S. cellulosum* So ce56

#### 3.3.1. UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie wurde verwendet, um die Reinheit der Proteinpräparationen zu überprüfen, diente aber auch dazu, erste Informationen über die Ferredoxine und die Art der inkorporierten Eisen-Schwefel-Cluster zu erhalten.

Die Ferredoxine Fdx1 und Fdx5 zeigten eine rötlich-braune Färbung und wiesen mit den auf den Eisen-Schwefel-Cluster zurückzuführenden Maxima bei 455 nm, 411 nm und 321 nm (Fdx1) bzw. 454 nm, 418 nm und 336 nm (Fdx5) die für [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine typischen spektrale Eigenschaften auf (Tabelle 3.3.1 und Abbildung 3.3.1A) wie sie auch von Adx (lokale Maxima im sichtbaren Bereich bei 455 nm, 414 nm und 320 nm (Uhlmann und Bernhardt, 1995) oder Pdx (lokale Maxima im sichtbaren Bereich bei 455 nm, 415 nm und 325 nm (Tyson *et al.*, 1972)) bekannt sind. Hinsichtlich Fdx3 ergab die „Pfam“-Analyse keinen Hinweis auf die Art des Eisen-Schwefel-Clusters in diesem Protein, jedoch zeigten sich in der phylogenetischen Analyse Ähnlichkeiten zu dem [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxin aus *Clostridium pasteurianum*. Das UV/Vis-Spektrum von Fdx3 weist lokale Maxima bei 330 nm, 462 nm und 545 nm auf und ähnelt damit den Spektren der [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine aus *C. pasteurianum* (Fujinaga und Meyer, 1993) und *Azotobacter vinelandii* (Chatelet und Meyer, 1999), die beide zur Gruppe der Thioferredoxin-artigen Ferredoxine gehören. Allerdings soll darauf hingewiesen werden, dass bei dem Fdx3-Spektrum das typische lokale Maximum bei 420 nm fehlt, das sowohl im Spektrum des Ferredoxins aus *C. pasteurianum* als auch in dem des *Azotobacter vinelandii* Proteins vorhanden ist.

Die Ferredoxine Fdx2 und Fdx8 waren grün-bräunlich bzw. dunkelbraun gefärbt und zeigten im Gegensatz zu den [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen nur ein einziges, relativ schwach ausgeprägtes, durch den Eisen-Schwefel-Cluster hervorgerufenen lokales Maximum zwischen 390 nm und 400 nm (Tabelle 3.3.1 und Abbildung 3.3.1B). Diese Spektralform mit der breiten Absorptionsbande zwischen 380 nm und 400 nm ist typisch für Eisen-Schwefel Proteine mit mehr als zwei Eisenatomen pro Proteinmolekül; allerdings erlauben die UV/Vis-Spektren der Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine keine Unterscheidung zwischen [3Fe-4S]-Cluster, [4Fe-4S]-Cluster oder Di-cluster (d.h. 7Fe oder 8Fe) Ferredoxinen (Lovenberg, 1973; Sticht und Rosch, 1998).



**Abbildung 3.3.1: UV/Vis-Spektren der oxidierten *S. cellulorum* So ce56 Ferredoxine**

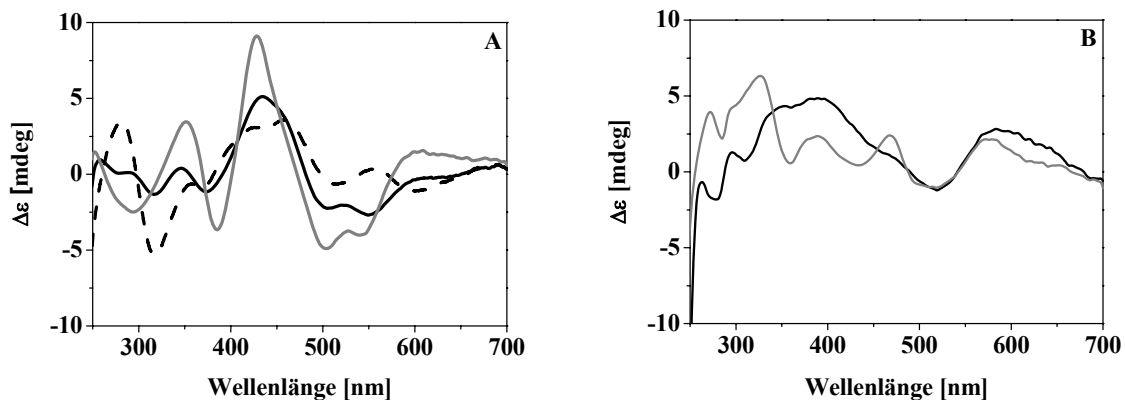
In Abbildung 3.3.1A sind die Spektren der [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine Fdx1 (schwarze Linie, kompakt), Fdx3 (schwarze Linie, gestrichelt) und Fdx5 (graue Linie) abgebildet. Die UV/Vis-Spektren der beiden Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine Fdx2 (schwarze Linie) und Fdx8 (graue Linie) sind in Abbildung 3.3.1B dargestellt. Die jeweiligen charakteristischen Maxima sind in Tabelle 3.3.1 zusammengefasst. Die Proben enthielten jeweils ca. 20 µM Protein in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, die Schichtdicke der Küvette betrug 1cm.

**Tabelle 3.3.1: Charakteristische spektrale Eigenschaften der Ferredoxine aus *S. cellulorum* So ce56**

Protein	Farbe	UV/Vis Absorptionsmaxima	CD Absorptionsmaxima	g-Faktor
Fdx1	rotbraun	321 nm 411 nm 455 nm	435 nm 347 nm 295 nm	$g_1= 2,022$ $g_2= 1,937$ $g_3= 1,928$
Fdx2	braun-grün	390 nm	584 nm 389 nm 296 nm 263 nm	$g_1= 2,020$ $g_2= 1,998$ $g_3= 1,963$
Fdx3	rotbraun	330 nm 462 nm 545 nm	557 nm 458 nm 429 nm 281 nm	$g_1= 2,000$ $g_2= 1,960$ $g_3= 1,918$
Fdx5	rotbraun	336 nm 418 nm 454 nm	428 nm 351 nm 252 nm	$g_1= 2,046$ $g_2= 1,954$ $g_3= 1,890$
Fdx8	dunkelbraun	400 nm	578 nm 468 nm 389 nm 327 nm 272 nm	$g_1= 2,021$ $g_2= 1,990$ $g_3= 1,960$

### 3.3.2. CD-Spektroskopie

Als Ergänzung zu den mittels UV/Vis-Spektroskopie erhaltenen Informationen wurden auch CD-spektroskopische Messungen durchgeführt, die weitere Hinweise auf die Chromophorbindung – insbesondere der [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine – liefern können. Denn die CD-Spektren von [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen zeichnen sich generell im sichtbaren Bereich durch eine hohe Ähnlichkeit aus, was auf eine ähnliche Chromophorbindung schließen lässt (Lovenberg, 1973). Dies gilt auch für die Spektren der myxobakteriellen [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine (Abbildung 3.3.2.1A), wobei besonders das Fdx1-Spektrum mit den Maxima bei 259 nm, 347 nm und 435 nm, der Schulter bei 295 nm und den beiden Minima bei 505 nm und 550 nm sehr ähnlich zu den Spektren anderer [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine wie z.B. Adx oder dessen *Schizosaccharomyces pombe* Homolog Etp1<sup>fd</sup> ist (Palmer *et al.*, 1967; Bureik *et al.*, 2002; Schiffler *et al.*, 2004a). Diese hohe Übereinstimmung der Spektren weist auf verwandte Proteinstrukturen hinsichtlich der Koordination und der Umgebung des Eisen-Schwefel Clusters hin. Im Vergleich dazu zeigt Fdx5 leichte Abweichungen, besonders um 300 nm, wo die Schulter fehlt, sowie zwischen 500 nm und 560 nm, wo eine leichte Verschiebung sowie eine Umkehrung der relativen Intensitäten der Minima bei 504 nm und 540 nm zu beobachten ist. Das Fdx3-Spektrum hingegen weist einige charakteristische Unterschiede auf. Anstatt des für [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine typischen, deutlich ausgeprägten Maximums bei etwa 430 nm zeigt das Fdx3 Signal in dieser Region eine Doppelspitze mit Maxima bei 429 nm und 458 nm. Auch im Bereich des nahen UV bis zu einer Wellenlänge von 400 nm treten deutliche Unterschiede zu Tage. Das lokale Maximum bei etwa 350 nm, das sowohl bei Fdx1 als auch bei Fdx5 zu beobachten ist, ist im Fall des Fdx3 zu einer Schulter (357 nm) abgeschwächt; stattdessen tritt aber bei 281 nm ein starkes positives Signal auf. Im längerwelligen Bereich jenseits des Doppelmaximums befinden sich wie bei den anderen Ferredoxinen auch zwei lokale Minima (515 nm und 600 nm), die im Fall des Fdx3 jedoch deutlich verbreitert sind. Diese Abweichungen des Fdx3-Spektrums zu den Spektren anderer [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine unterstreicht die Unterschiede zwischen diesem Protein und den anderen [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen und bestätigt damit die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse und der UV/Vis-Spektroskopie.

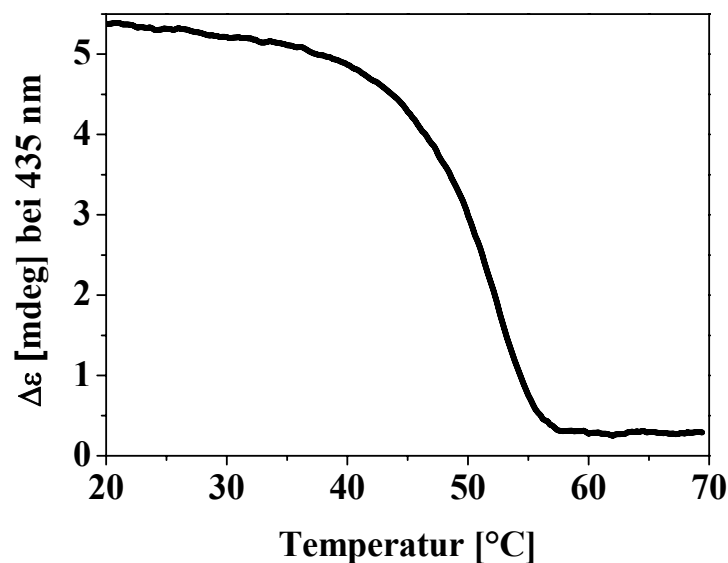


**Abbildung 3.3.2.1: CD-Spektren der *S. cellulorum* So ce56 Ferredoxine im nahen UV sowie im sichtbaren Bereich**

In Abbildung 3.3.2.1A sind die CD-Spektren der [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine Fdx1 (schwarze Linie, kompakt), Fdx3 (schwarze Linie, gestrichelt) und Fdx5 (graue Linie) abgebildet. Die Spektren der beiden Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine Fdx2 (schwarze Linie) und Fdx8 (graue Linie) sind in Abbildung 3.3.2.1B dargestellt. Im Fall der [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine enthielten die Proben jeweils ca. 100  $\mu\text{M}$  Protein, im Falle der Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine betrug die Konzentration dagegen 1500 $\mu\text{M}$  (Fdx2 ) bzw. 540  $\mu\text{M}$  (Fdx8).

Die CD-Spektren der Ferredoxine Fdx2 und Fdx8 sind in Abbildung 3.3.2.1B dargestellt. Trotz der hohen eingesetzten Proteinkonzentrationen wurden nur relativ schwache CD-Signale gemessen, was für Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine des Monocluster-Typs nicht ungewöhnlich ist. Auffällig ist, dass die Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine im Gegensatz zu den [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen deutliche Unterschiede im Verlauf ihrer CD-Spektren aufweisen (Lovenberg, 1973; Stephens *et al.*, 1978). Während Fdx2 im UV-Bereich zwei lokale Maxima bei 263 nm und 296 nm sowie im sichtbaren Bereich zwei relativ breite Maxima bei 389 nm und 585 nm aufweist, zeigt Fdx8 im Bereich von 250 nm bis 500 nm eine stärkere Strukturierung. Das absolute Maximum liegt bei 389 nm, drei weitere lokale Maxima liegen bei 468 nm, 327 nm und 272 nm. Den beiden Ferredoxinen Fdx2 und Fdx8 gemeinsam ist ein Minimum bei 519 nm bzw. 518 nm und das darauffolgende breitere Signal mit dem Maximum bei etwa 580 nm. Damit ermöglicht es die CD-Spektroskopie – im Gegensatz zur UV/Vis-Spektroskopie – mit ihren deutlich stärker strukturierten Spektren zwischen Fdx2 und Fdx8 zu unterscheiden. Die hier gezeigten CD-Spektren können daher dazu herangezogen werden, beide Ferredoxine sowohl voneinander als auch von anderen Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen zu unterscheiden.

Außerdem wurden CD-Messungen durchgeführt, bei denen die thermische Denaturierung der Ferredoxine anhand der Änderung des CD-Signals verfolgt wurde. Abbildung 3.3.2.2 zeigt beispielhaft die Änderung des CD-Signals von Fdx1 bei 435 nm bei einer konstanten Temperaturzunahme von 1 °C/min ausgehend von 20°C bis zu 70°C. Ähnliche Messungen wurden für alle zur Verfügung stehende myxobakterielle Ferredoxine durchgeführt (siehe Anhang 6.5.).



**Abbildung 3.3.2.2: Schmelzkurve des *S. cellulosum* So ce56 Ferredoxins Fdx1**

Dargestellt ist die Änderung des CD-Signals von Fdx1 bei 435 nm (dem [2Fe-2S]-Cluster abhängigen Maximum im sichtbaren Bereich) in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Temperatur wurde ausgehend von 20°C konstant um 1 °C/min erhöht. Die verwendete Probe enthielt Fdx1 in einer ca. 100 µM Konzentration.

Ausgehend von den aufgezeichneten Kurven konnte mittels Regression die Halbumwandlungstemperatur  $T_m$ , d.h. die Temperatur, bei der das Protein zu 50 % denaturiert ist, berechnet werden. Die für das jeweilige Protein gewählte Wellenlänge, der gewählte Temperaturbereich sowie die errechnete Halbumwandlungstemperatur sind in Tabelle 3.3.2 aufgeführt. Es fällt auf, dass die einzelnen Ferredoxine eine unerwartet hohe Thermostabilität aufweisen, insbesondere wenn man bedenkt, dass die überwiegende Mehrheit der Myxobakterien mesophil ist (Gerth und Müller, 2005) und auch *Sorangium cellulosum* So ce56 optimales Wachstum bei 34 °C erreicht (Pradella *et al.*, 2002). Die mit



51,1°C deutlich niedrigste Halbumwandlungstemperatur wurde bei Fdx1 gefunden. Interessanterweise liegt dieser Wert sehr nahe an dem für den Adx Wildtyp publizierten Wert von 49,1°C (Uhlmann und Bernhardt, 1995). Sowohl die anderen beiden [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine Fdx3 und Fdx5 als auch die beiden Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine Fdx2 und Fdx8 hingegen weisen deutlich höhere Halbumwandlungstemperaturen von über 60°C auf, wobei besonders Fdx5 mit einer Tm von fast 78°C hervorzuheben ist. Allerdings weist auch das Adx-Homolog aus der Spalthefe Etp1<sup>fd</sup> (Wildtyp) mit 70,5°C (Hannemann *et al.*, 2002b) eine Halbumwandlungstemperatur auf, die in demselben Bereich liegt.

**Tabelle 3.3.2: Thermische Denaturierung der Ferredoxine aus *S. cellulosum* So ce56**

Die Änderung des CD-Signals bei einem Temperaturanstieg von 1 °C/min in dem angegebenen Temperaturbereich wurde bei einer für das jeweilige Protein geeigneten Wellenlänge verfolgt. Die Halbumwandlungstemperatur Tm wurde mit dem Programm „SigmaPlot 2001“ bestimmt.

Protein	Wellenlänge [nm]	Temperaturbereich [°C]	Halbumwandlungstemperatur Tm [°C]
Fdx1	435	20-70	51,1
Fdx2	390	20-85	65,3
Fdx3	460	20-80	64,5
Fdx5	428	20-80	77,8
Fdx8	474	20-85	69,0

### 3.3.3. ESR-Spektroskopie

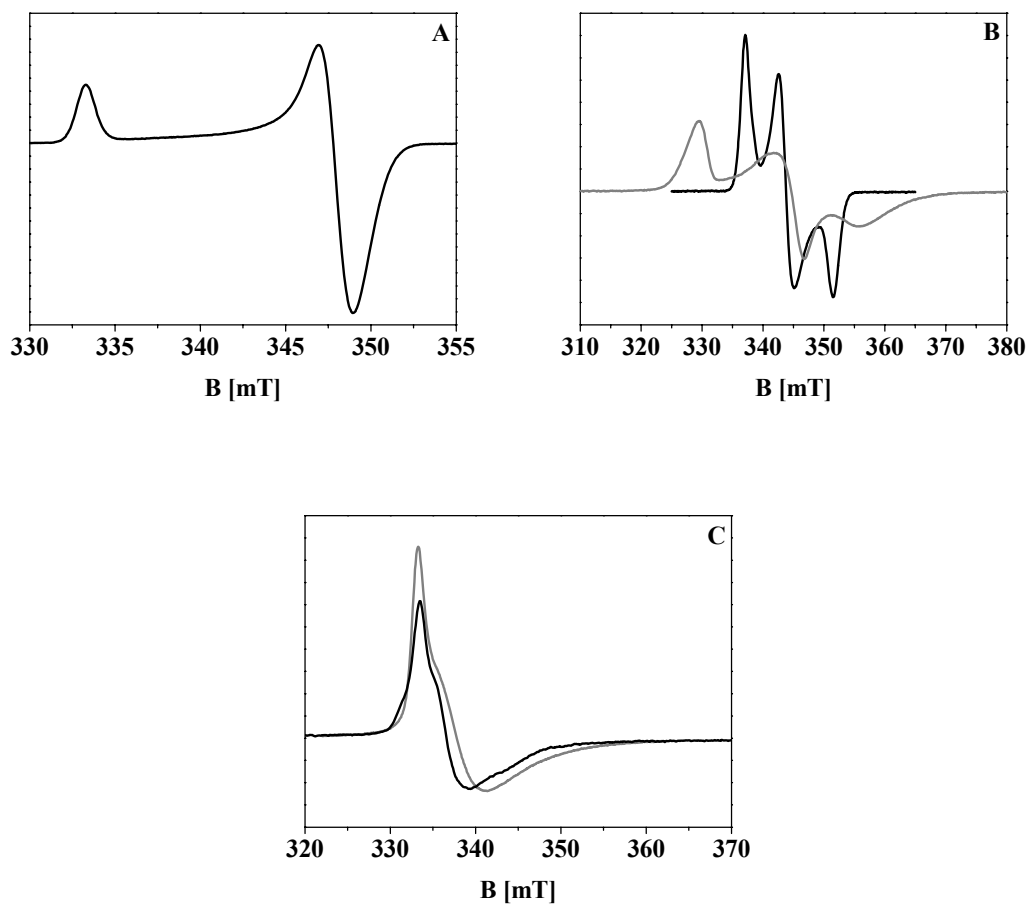
Da es nicht möglich ist, mittels UV/Vis-Spektroskopie zwischen [3Fe-4S]-Cluster, [4Fe-4S]-Cluster oder Dicluster (7Fe oder 8Fe) Ferredoxinen zu unterscheiden, wurden zur weiteren Charakterisierung ESR-Messungen durchgeführt. Aber auch im Hinblick auf die [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine kann die ESR-Spektroskopie wichtige Informationen hinsichtlich ihrer möglichen Funktionen liefern, da bei [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen des Pflanzen-Typs rhombische ESR-Spektren zu finden sind, während [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine aus Cytochrom P450 Systemen normalerweise axiale ESR-Spektren aufweisen (z. B. Adx oder Pdx (Palmer *et al.*, 1967; Lovenberg, 1973; Cammack *et al.*, 1999)).

Generell können [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine in der ESR nur im reduzierten Zustand [2Fe-2S]<sup>1+</sup> nachgewiesen werden, da sie nur dann paramagnetisch (Gesamtspin S' des Clusters = 1/2) sind. Daher wurde den Proben Fdx1, Fdx3 und Fdx5 vor der Messung unter aeroben Bedingungen das Reduktionsmittel Dithionit zugegeben. Das dergestalt reduzierte Fdx1 weist ein axiales ESR-Spektrum auf (Abbildung 3.3.3.1A). Auch die simulierten g-Faktoren von Fdx1 (Tabelle 3.3.1) stimmen gut mit den Werten von Ferredoxinen aus typischen Cytochrom P450 Klasse I Systemen wie Adx oder Pdx (Lovenberg, 1973) überein. Allerdings weisen die g-Werte von Fdx1 auf eine etwas stärker rhombische g-Symmetrie als beim Adx hin.

Im Gegensatz zu Fdx1 zeigen die reduzierten Formen von Fdx3 und Fdx5 rhombische ESR-Spektren (Abbildung 3.3.3.1B). Das ESR-Spektrum von Fdx3 sowie die entsprechenden g-Tensoren (Tabelle 3.3.1) ähneln denen der [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine aus *C. pasteurianum* (g<sub>1</sub>=2,00, g<sub>2</sub>=1,95, g<sub>3</sub>=1,92 (Fujinaga und Meyer, 1993)) und *A. vinelandii* (g<sub>1</sub>=2,01, g<sub>2</sub>=1,94, g<sub>3</sub>=1,92 (Chatelet und Meyer, 1999)). Die g-Tensoren von Fdx5 andererseits erinnern eher an typische Pflanzen-Typ Ferredoxine wie Spinat Ferredoxin (g<sub>1</sub>=2,05, g<sub>2</sub>=1,96, g<sub>3</sub>=1,89) oder das Ferredoxin aus Petersilie (g<sub>1</sub>=2,05, g<sub>2</sub>=1,96, g<sub>3</sub>=1,90) (Lovenberg, 1973).

Beide Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine wurden bei 10 K gemessen und wiesen im oxidierten Zustand mit g-Faktoren von g<sub>1</sub>= 2,020, g<sub>2</sub>= 1,998 und g<sub>3</sub>= 1,963 (Fdx2) bzw. g<sub>1</sub>= 2,021, g<sub>2</sub>= 1,990 und g<sub>3</sub>= 1,960 (Fdx8) relativ ähnliche ESR-Signale auf (Abbildung 3.3.3.1C), die auf einen oxidierten [3Fe-4S]<sup>1+</sup> Cluster mit S = 1/2 Cluster schließen lassen (Guigliarelli und Bertrand, 1999). Ähnliche Spektren wurden auch für andere [3Fe-4S]-Cluster Ferredoxine wie beispielsweise Fdmor aus dem P450mor System von *Mycobacterium* sp. Stamm HE5 (g<sub>1</sub>=2,023, g<sub>2</sub>=2,013, g<sub>3</sub>=1,998 (Sielaff und Andreesen, 2005b)) oder das zum CYP51 System gehörende Ferredoxin aus *M. tuberculosis* (McLean *et al.*, 2006) beschrieben. Auch die Tatsache, dass die Signale bei einer Erhöhung der Temperatur kaum noch

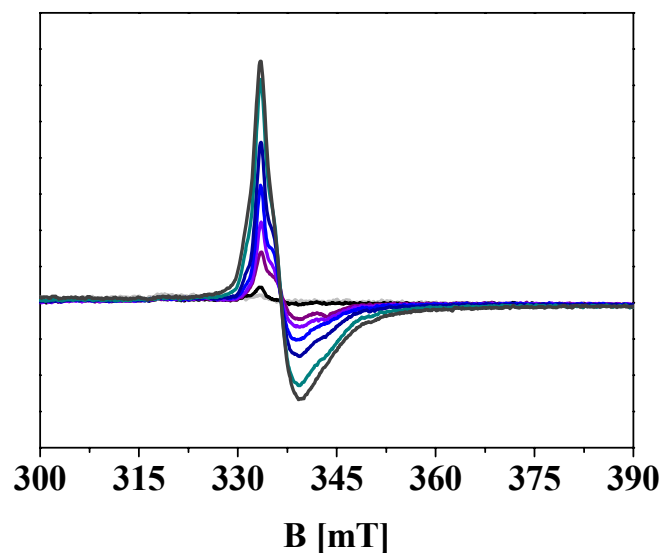
nachzuweisen waren, deutet auf einen  $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$  Cluster mit kurzer Relaxationszeit als prosthetische Gruppe hin. Die Reduktion der Ferredoxine mit Dithionit geht einher mit dem Verschwinden der ESR-Signale, was durch die Umwandlung der ESR-aktiven  $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$  Form in die ESR-stille  $[3\text{Fe-4S}]^0$  Form erklärt werden kann. Weder bei Fdx2 noch bei Fdx8 wurde infolge der Reduktion das Auftauchen eines  $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster Signals beobachtet.



**Abbildung 3.3.3.1: ESR-Spektren der *S. cellulorum* So ce56 Ferredoxine**

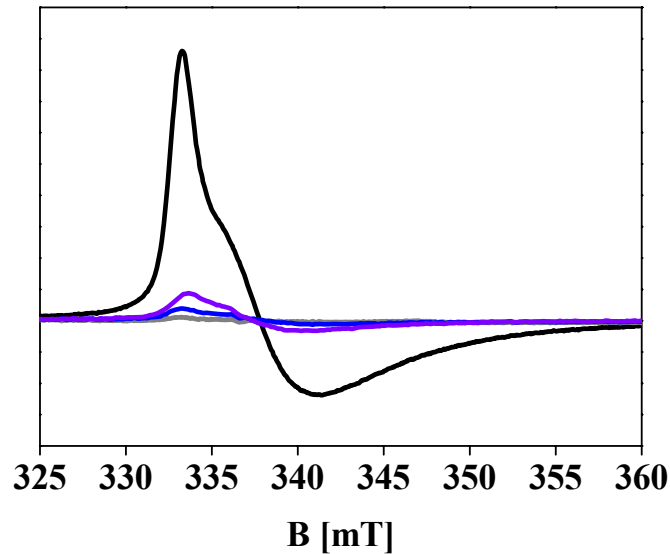
Abbildung 3.3.3.1A zeigt das Spektrum des axialen  $[2\text{Fe-2S}]$ -Cluster Ferredoxins Fdx1, das mit einer Mikrowellenleistung von 6 mW bei einer Temperatur von 20 K (-253 °C) aufgenommen wurde. In Abbildung 3.3.3.1B sind die Spektren der rhombischen  $[2\text{Fe-2S}]$ -Cluster Ferredoxine Fdx3 (schwarze Linie) und Fdx5 (graue Linie) abgebildet. Die bei 10 K gemessenen ESR-Spektren der beiden oxidierten Nicht- $[2\text{Fe-2S}]$ -Cluster Ferredoxine Fdx2 (schwarze Linie) und Fdx8 (graue Linie) sind in Abbildung 3.3.3.1C dargestellt. Das Fdx2 Signal wurde mit einer Probe aufgenommen, in der  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  in zweifachem Überschuss enthalten war. Die Proben enthielten jeweils ca. 150  $\mu\text{M}$  Protein in 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4.

Dennoch zeigten beide Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine aus *S. cellulosum* So ce56 ein unerwartetes Verhalten während der ESR-Messungen. Fdx2 zeigte im unbehandelten Zustand nur ein relativ schwaches [3Fe-4S]-Cluster Signal, das allerdings durch Zugabe von  $K_3[Fe(CN)_6]$  an Intensität gewann (Abbildung 3.3.3.2). Dies wurde so interpretiert, dass Fdx2 offenbar „natürlicherweise“ größtenteils in reduziertem Zustand vorliegt, obwohl alle Reinigungsschritte sowie die Vorbereitung der ESR-Probe unter aeroben Bedingungen erfolgten. Fdx8 hingegen liegt bei gleicher Behandlung wie zu erwarten in oxidiert Form vor und liefert ein Spektrum mit einem scharf abgegrenzten Signal bei  $g_1 = 2,021$  und etwas verbreiterten Signalen bei höheren Feldstärken. Allerdings ist im Fall von Fdx8 zu beobachten, dass eine aerobe Reduktion mit Dithionit im Überschuss nur eine geringe Verminderung der Signalintensität nach sich zieht. Um eine vollständige Reduktion zu erreichen, muss die Dithionitzugabe unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden, was auf eine hohe Reaktionsbereitschaft mit molekularem Sauerstoff hindeutet. Die Vermutung, dass Fdx8 bereitwillig reoxidiert, wird auch durch die Beobachtung bestätigt, dass bei der anaerob reduzierten Probe das ESR-Signal nach Kontakt mit Luftsauerstoff wieder detektierbar wird (Abbildung 3.3.3.3), obwohl Dithionit im Überschuss zugegeben wurde.



**Abbildung 3.3.3.2: Titration des *S. cellulosum* So ce56 Ferredoxins Fdx2**

Die ESR-Spektren wurden bei 10 K unter Standardbedingungen gemessen. Die Proben enthielten jeweils ca. 150  $\mu$ M Fdx2 in 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4. Dithionit bzw. Kaliumhexacyanoferrat  $K_3[Fe(CN)_6]$  wurde unter aeroben Bedingungen zugegeben. Die hier gezeigten Proben enthielten Fdx2 (schwarz), Fdx2 mit Dithionit (hellgrau) bzw. Fdx2 mit  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Die Fdx2 Ansätze mit dem Oxidationsmittel wiesen folgendes Verhältnis von  $K_3[Fe(CN)_6]$  : Fdx2 auf: purpur: 0,2; violett: 0,4; blau: 0,6; dunkelblau: 0,9; blaugrün: 2; dunkelgrau: 4,0.



**Abbildung 3.3.3.2: Reduktion und Reoxidation des *S. cellulosum* So ce56 Ferredoxins Fdx8**

Die ESR-Spektren wurden bei 10 K unter Standardbedingungen gemessen. Die Proben enthielten jeweils ca. 150  $\mu\text{M}$  Fdx8 in 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4. Festes Dithionit wurde unter anaeroben Bedingungen zugegeben. Die Reoxidation erfolgte durch Kontakt der reduzierten Probe mit Luftsauerstoff bei Raumtemperatur. Die hier gezeigten Proben enthielten oxidiertes Fdx8 (schwarz), Fdx8 mit Dithionit (grau) bzw. reoxidiertes Fdx8 (blau: 20 min. unter aeroben Bedingungen im ESR-Röhrchen; violett: weitere 20 min. unter aeroben Bedingungen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß, d.h. mit vergrößerter Oberfläche im Vergleich zum ESR-Röhrchen).

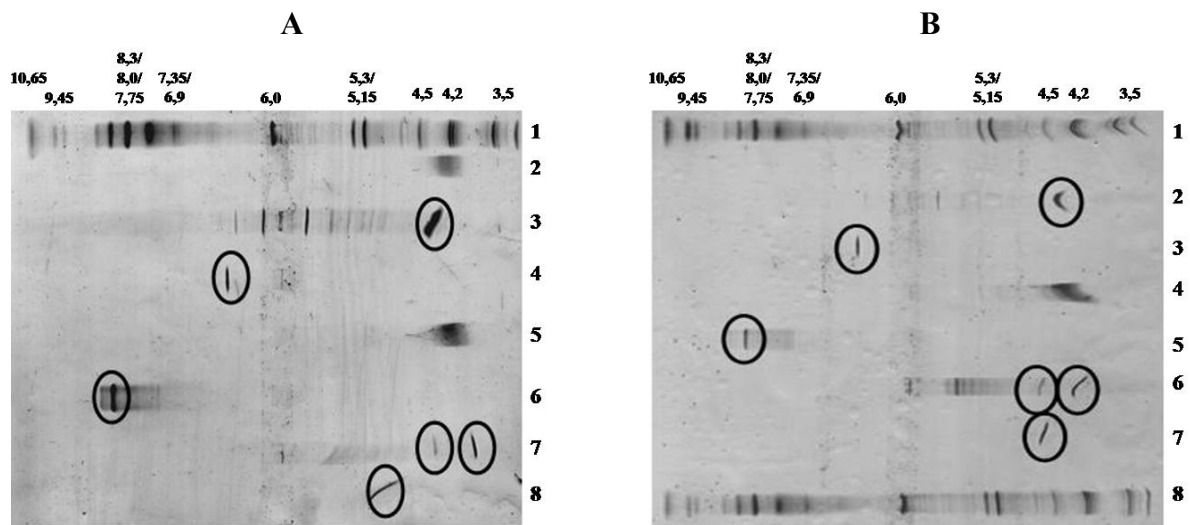
**3.3.4. Isoelektrische Fokussierung**

Mithilfe der isoelektrischen Fokussierung sollte der theoretische pI (siehe Tabelle 3.1.1) experimentell überprüft werden. Wie aus Tabelle 3.3.4 ersichtlich ist, stimmen die experimentell ermittelten Werte mit den theoretisch vorhergesagten recht gut überein mit Abweichungen von unter 0,5 pH Einheiten. Die einzige Ausnahme bildet Fdx5, dessen experimentell bestimmter pI mit rund 6,5 um eine volle pH Einheit höher als erwartet liegt. Die Tatsache, dass dieser pI schon fast im neutralen Bereich liegt, deutet an, dass Fdx5 nicht das gesuchte, Cytochrom P450 assoziierte Ferredoxin sein sollte, da davon ausgegangen wird, dass bei der Wechselwirkung von Klasse I Ferredoxinen mit ihren Interaktionspartnern (Ferredoxin Reduktase und CYP) elektrostatische Aspekte eine Rolle spielen (Jenkins und Waterman, 1994; Sagara *et al.*, 1999; Schiffler *et al.*, 2004b). Aus demselben Grund erscheint auch Fdx3 als ein relativ unwahrscheinlicher Kandidat, da die isoelektrische Fokussierung für dieses Protein einen leicht basischen pI ergab. Bei den übrigen Ferredoxinen Fdx1, Fdx2 und Fdx8 hingegen konnten pI-Werte im sauren Bereich (unter 4,6) bestätigt werden. Allerdings soll noch auf eine Besonderheit des Fdx2 hingewiesen werden. Bei diesem Protein traten in allen Proben überraschenderweise statt einer zwei deutlich voneinander abgegrenzte Banden auf; dies könnte auf das Vorhandensein von zwei Spezies hindeuten, die sich durch das Auftreten bzw. die Anzahl von posttranslationalen Modifikationen, die die Nettoladung beeinflussen, unterscheiden.

**Tabelle 3.3.4: Vergleich zwischen den theoretischen und den experimentell ermittelten isoelektrischen Punkten der Ferredoxine aus *S. cellulorum* So ce56**

Für jedes Ferredoxin wurde die isoelektrische Fokussierung mindestens drei Mal durchgeführt. Der in der Tabelle angegebene experimentell ermittelte pI gibt den aus den einzelnen Messungen ermittelten Mittelwert an; n ist die Anzahl der Messwerte.

Protein	Theoretischer pI	Experimenteller pI	Standardabweichung	n
Fdx1	4,94	4,57	0,12	3
Fdx2	4,29	4,07/4,53	0,25/0,15	3/3
Fdx3	8,34	7,93	0,06	3
Fdx5	5,47	6,48	0,10	4
Fdx8	4,32	4,36	0,09	5



**Abbildung 3.3.4: IEF der Ferredoxine aus *S. cellulosum* So ce56**

A) 1: Marker; 2: Kontrolle Adx WT; 3: Fdx8; 4: Fdx5; 5: Kontrolle Adx WT; 6: Fdx3; 7: Fdx2; 8: Fdx1. B) 1: Marker; 2: Fdx8; 3: Fdx5; 4: Kontrolle Adx WT; 5: Fdx3; 6: Fdx2; 7: Fdx1; 8:Marker

Der IEF-Marker enthält folgende Proteine: Amyloglucosidase (pI 3,5); Glucoseoxidase (pI 4,2); Trypsininhibitor (pI 4,5); ( $\beta$ -Lactoglobulin (pI 5,15/5,3); Carboanhydrase (pI 6,0); Myoglobin (Pferd, pI 6,9/7,35); Lentillectin (pI 7,75/8,0/8,3); Ribonuklease A (pI 9,45); Cytochrome c (pI 10,65).

**3.3.5. Eisenbestimmung mittels ICP-OES**

Um den Eisengehalt der Ferredoxine zu bestimmen, wurden die Proteine durch Zugabe von Trichloressigsäure denaturiert und die Konzentration des herausgelösten Eisens durch ICP-OES Messungen bestimmt. Mithilfe der bekannten Proteinkonzentration konnte so das molare Verhältnis von Eisen zu Ferredoxin bestimmt werden. Die Ergebnisse der Eisenbestimmung sind in Tabelle 3.3.5 aufgeführt. Die für die [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine erhaltenen Werte stimmen gut mit den durch die „Pfam“-Analyse bestimmten zu erwartenden Werten überein. Besonders Fdx1 entspricht mit einem experimentell ermittelten Wert von  $1,95 \pm 0,07$  mol Fe pro mol Fdx genau dem theoretisch zu erwartenden Wert von 2 mol Fe pro mol Fdx. Auch der Wert des Fdx8 liegt mit  $2,68 \pm 0,07$  mol Fe pro mol Fdx in der Nähe des erwarteten Wertes von 3 mol Fe pro mol Fdx, wobei ein leichter Eisenverlust die Erklärung für die Abweichung des theoretisch zu erwartenden Wertes vom experimentell ermittelten Wert sein könnte. Fdx2 hingegen weist überraschenderweise mit  $1,49 \pm 0,20$  mol Fe pro mol Fdx einen Eisenanteil auf, der genau der Hälfte des erwarteten Eisengehaltes entspricht.

**Tabelle 3.3.5: Eisengehalt der Ferredoxine aus *S. cellulosum* So ce56**

Um den Eisengehalt der Ferredoxine Fdx1, Fdx3, Fdx5 und Fdx8 zu ermitteln wurden jeweils 3 Proben mit unterschiedlicher Proteinkonzentration eingesetzt; im Fall des Fdx2 wurden insgesamt 9 Proben gemessen. Die Detektion erfolgte bei vier Wellenlängen; die Werte, die mit den am besten geeigneten Wellenlängen (238,204 nm und 239,562 nm) erhalten wurden, wurden für die Auswertung herangezogen.

Protein	Messung bei 238,204 nm [μmol Fe/μmol Fdx]	Messung bei 239,562 nm [μmol Fe/μmol Fdx]	Mittelwert [μmol Fe/μmol Fdx]
Fdx1	1,97 $\pm$ 0,08	1,93 $\pm$ 0,06	1,95 $\pm$ 0,07
Fdx2	1,47 $\pm$ 0,22	1,50 $\pm$ 0,18	1,49 $\pm$ 0,20
Fdx3	1,80 $\pm$ 0,08	1,78 $\pm$ 0,09	1,79 $\pm$ 0,08
Fdx5	2,31 $\pm$ 0,04	2,31 $\pm$ 0,05	2,31 $\pm$ 0,04
Fdx8	2,69 $\pm$ 0,07	2,67 $\pm$ 0,07	2,68 $\pm$ 0,07

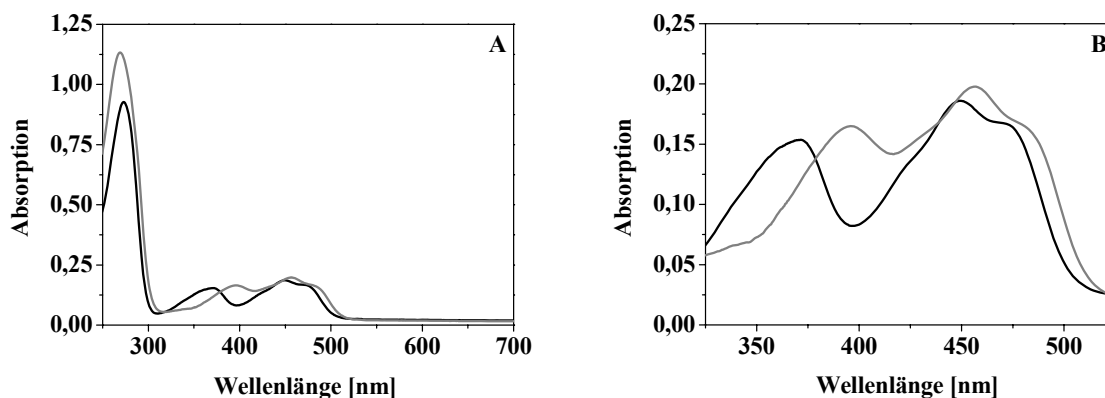


### 3.4. Charakterisierung der Ferredoxin Reduktasen aus *S. cellulorum* So ce56

#### 3.4.1. UV/Vis-Spektroskopie

##### 3.4.1.1. UV/Vis-Spektroskopie der Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB im oxidierten Zustand

Beide Ferredoxin Reduktasen zeigten im oxidierten Zustand die für Flavoproteine typische gelbe Färbung. Die spektralen Eigenschaften der oxidierten FdRA (Tabelle 3.4.1, Abbildung 3.4.1.1A und B) mit lokalen Maxima bei 369 nm und 448 nm sowie eine Schulter bei 473 nm sind typisch für Ferredoxin Reduktasen. Diese Werte stimmen sehr gut mit denen anderer Ferredoxin Reduktasen überein, von denen eine Aktivität in Cytochrom P450 Systemen bekannt ist, wie beispielsweise die der Adrenodoxin Reduktase (Maxima bei 376 und 450 nm, Schulter bei 475 nm (Sagara *et al.*, 1993)) oder der Putidaredoxin Reduktase (Maxima bei 379 und 455 nm, Schulter bei 480 nm (Sevrioukova und Poulos, 2002)). Im Fall der oxidierten FdRB war eine leichte bathochrome Verschiebung des Spektrums zu beobachten; FdRB wies lokale Maxima bei 388 nm und 457 nm sowie eine Schulter bei 490 nm auf (Tabelle 3.4.1, Abbildung 3.4.1.1B).



**Abbildung 3.4.1.1: UV/Vis-Spektren der oxidierten *S. cellulorum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen**

Abbildung 3.4.1.1A zeigt die UV/Vis-Spektren der beiden Ferredoxin Reduktasen FdRA (schwarze Linie) und FdRB (graue Linie), Abbildung 3.4.1.1B zeigt im Detail den für den oxidierten Flavinchromophor typischen Bereich. Die jeweiligen charakteristischen Maxima sind in Tabelle 3.4.1 zusammengefasst. Die Proben enthielten jeweils 20  $\mu$ M Protein in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, die Schichtdicke der Küvette betrug 1cm.

**Tabelle 3.4.1: Charakteristische Eigenschaften der Ferredoxin Reduktasen aus *S. cellulosum* So ce56**

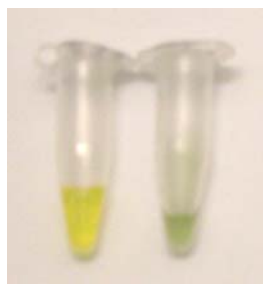
Gezeigt werden die Charakteristika der Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB, die mittels UV/Vis-Spektroskopie, CD-Spektroskopie und ESR-Spektroskopie bestimmt wurden.

Protein	Farbe	UV/Vis Absorptionsmaxima (Schulter)	CD Absorptionsmaxima	ESR Apparenter g-Faktor	ESR Semichinon (Linienbreite)
FdRA	Gelb	369 nm 448 nm (473 nm)	277 nm 368 nm	$g = 2,004$	17,5 G
FdRB	Gelb	388 nm 457 nm (490 nm)	276 nm 388 nm	$g = 2,004$	19,0 G

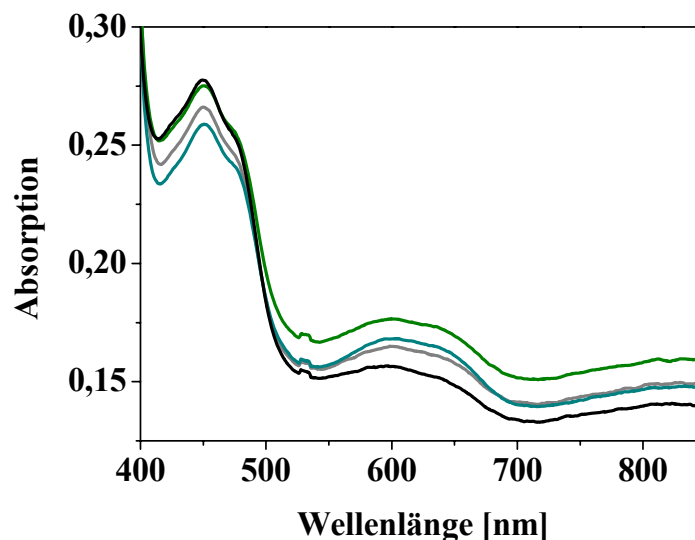
Zusätzlich zu den Informationen, die aus den UV/Vis-Spektren der oxidierten Ferredoxin Reduktasen gewonnen werden können, bietet die UV/Vis-Spektroskopie auch die Möglichkeit zu einer weitergehenden Charakterisierung der Flavoproteine, wenn man ihr Verhalten bei Zugabe von Reduktionsmitteln verfolgt. Denn Flavoproteine können unter anderem auch danach klassifiziert werden, ob sie in der Lage sind, ein Flavinradikal zu stabilisieren oder ob sie bei Reduktion direkt in die Hydrochinonform übergehen, da die Semichinonbildung eine Rolle beim Reaktionszyklus spielen kann. Wird ein Flavinradikal gebildet, so kann dieses entweder als neutrales (blaues) oder aber als anionisches (rotes) Semichinon vorliegen (vgl. Abbildung 1.3). Die beiden Semichinonformen unterscheiden sich in ihren spektralen Eigenschaften: während ein charakteristisches Absorptionsmaximum des blauen Semichinons bei längeren Wellenlängen von 580 nm – 620 nm auftritt, zeigt das rote Semichinon eine starke Absorption bei ca. 380 nm sowie ein zusätzliches scharf abgegrenztes lokales Maximum bei etwa 400 nm (Macheroux, 1999). Zudem sind einige Flavoproteine in der Lage, *Charge Transfer* (CT) Komplexe mit kleinen Molekülen wie NAD(P)H zu bilden, die ebenfalls durch das Auftreten neuer Maxima im langwelligen Bereich charakterisiert sind (Massey und Ghisla, 1974).

### 3.4.1.2. UV/Vis-Spektroskopie der FdRA bei Reduktion

Gibt man NADPH als Reduktionsmittel zu der myxobakteriellen putativen Ferredoxin Reduktase FdRA, so ist umgehend eine Farbänderung der Probe zu beobachten. Das im oxidierten Zustand kräftig gelb gefärbte Protein nimmt eine grünliche Färbung an (Abbildung 3.4.1.2A). Diese Farbänderung erinnert an Beobachtungen, die bei anderen Flavoproteinen, wie z.B. dem OYE („Old Yellow Enzyme“), gemacht wurden: auch hier wurden grüne Formen beobachtet, die auf die Bildung von CT Komplexen zurückzuführen waren (Massey und Ghisla, 1974).



**Abbildung 3.4.1.2A: Oxidierte FdRA (links, gelb) im Vergleich zu mit NADPH behandelter FdRA (rechts, grün)**



**Abbildung 3.4.1.2B: Reduktion der *S. cellulorum* So ce56 FdRA mit NADPH**

Das Verhältnis von NADPH : FdRA betrug 18 : 1. Zunächst wurden Spektren unter anaeroben Bedingungen aufgezeichnet, anschließend wurde die Probe Luftsauerstoff ausgesetzt und es wurden weitere Spektren unter aeroben Bedingungen aufgenommen. Die Probe enthielt 56  $\mu\text{M}$  FdRA in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, die Schichtdicke der Küvette betrug 1cm. Es wurden folgende Messungen durchgeführt: Anaerob: blaugrün:15 min Inkubation; grün: 30 min Inkubation. Aerob: grau: 30 min Inkubation; schwarz: 60 min Inkubation.

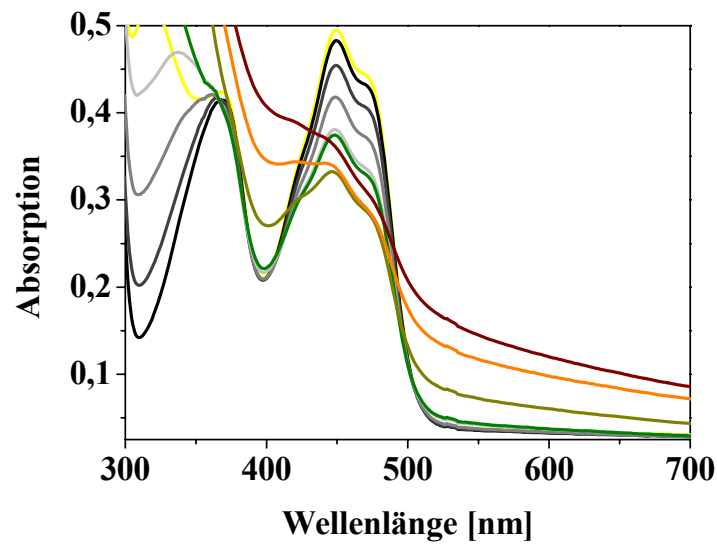
Betrachtet man das UV/Vis-Spektrum der FdRA nach Zugabe von NADPH, so zeigt sich noch immer ein Absorptionsmaximum bei ca. 450 nm, das allerdings in seiner Intensität im Vergleich zur oxidierten Probe abgenommen hat. Dies weist auf eine Abnahme an oxidiertem FdRA hin. Im Vergleich zum oxidierten Zustand neu hinzugekommen sind hingegen zwei breite Banden bei etwa 600 nm sowie bei  $> 750$  nm (Abbildung 3.4.1.2B). Diese Signale deuten auf die Bildung von CT Komplexen zwischen FAD und NADPH hin (Batie und Kamin, 1986). Die Bildung solcher Komplexe wurde für verschiedene Ferredoxin Reduktasen wie z.B. die Adrenodoxin Reduktase (Lambeth und Kamin, 1976) oder die Ferredoxin Reduktase aus *Anabaena* (Tejero *et al.*, 2007) beschrieben. Geht man davon aus, dass sich die FdRA ähnlich wie Ferredoxin Reduktase aus *Anabaena* verhält, so kann das Maximum bei etwa 600 nm auf die Bildung eines CT-1 Komplexes (FdRA<sub>ox</sub>-NADPH) zurückgeführt werden, während das Maximum bei ca. 800 nm das Vorhandensein eines CT-2 (FdRA<sub>red</sub>-NADP<sup>+</sup>) widerspiegelt.

Bringt man die Probe in Kontakt mit Luftsauerstoff, so ist wie zu erwarten eine langsame Abnahme der CT-assoziierten Maxima sowie eine Zunahme des Maximums bei 448 nm zu beobachten, was auf eine Reoxidation des Proteins schließen lässt.

Bezüglich der Bildung eines Semichinons kann mithilfe der UV/Vis-Spektroskopie im Fall der FdRA keine eindeutige Aussage getroffen werden. Auch wenn ein anionisches Semichinon mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann, so ist es dennoch möglich, dass die FdRA ein neutrales Semichinon stabilisiert. Da das charakteristische Absorptionsmaximum des blauen Semichinons bei längeren Wellenlängen (580 nm – 620 nm) liegt und damit mit dem Maximum des CT-1 überlappt, kann die Frage, ob es ein FdRA Semichinon gibt, an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

Um FdRA vollständig zu reduzieren, wurde die Probe unter anaeroben Bedingungen mit Dithionit (zunächst im Verhältnis 1:1, dann 10x Überschuss an Dithionit) gemischt. Da über einen Zeitraum von 15 min keine Farbänderung und kaum eine Änderung im Spektrum zu erkennen war, wurde weiter Dithionit zugegeben, bis ein ca. 30x Überschuss erreicht war. Auch unter diesen Bedingungen war zunächst keine Farbänderung sichtbar, nach einiger Zeit wurde die Probe jedoch farblos. Verfolgt man die Entwicklung der Spektren bei Inkubation unter anaeroben Bedingungen (Abbildung 3.4.1.2C), so sieht man, dass das für die oxidierte Form typische Absorptionsmaximum bei 448 nm mit der Zeit abnimmt. Die Reduktion scheint aber insgesamt relativ langsam abzulaufen. Setzt man die mit Dithionit reduzierte Probe Luftsauerstoff aus, so beobachtet man eine Gelbfärbung des Ansatzes, auch wenn die Färbung nicht mehr so intensiv wie bei der ursprünglichen Probe ausfällt. Diese Farbänderung

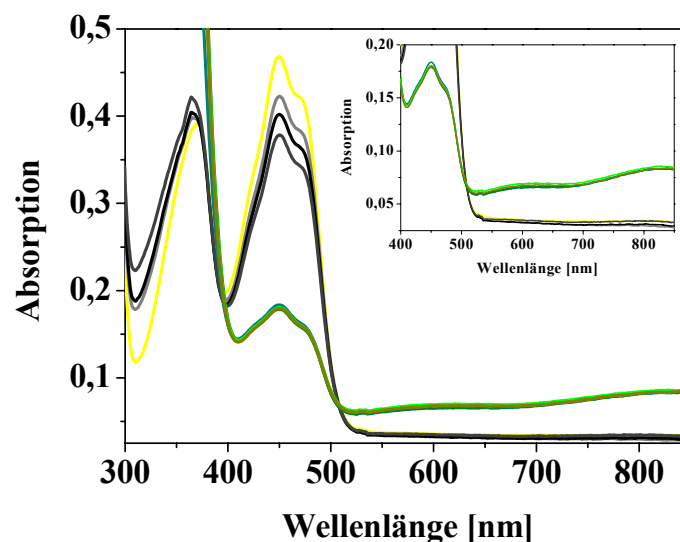
bei Kontakt mit Sauerstoff spiegelt sich auch in der Entwicklung des UV/Vis-Spektrums wider, das die für Flavoproteine charakteristische Form verliert, was auf eine veränderte Umgebung des Chromophors schließen lässt. Die Reduktion von FdRA mit Dithionit scheint also nicht reversibel zu sein, da vermutlich während der Reoxidation die Proteinstruktur verändert wird.



**Abbildung 3.4.1.2C: Reduktion der *S. cellulorum* So ce56 FdRA mit Dithionit**

Das Verhältnis von Natriumdithionit : FdRA betrug 26 : 1. Die gezeigten Spektren wurden unter anaeroben Bedingungen oder unter aeroben Bedingungen aufgenommen. Die Probe enthielt 59  $\mu\text{M}$  FdRA in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, die Schichtdicke der Küvette betrug 1cm. Gezeigt werden die Spektren folgender Messungen: Anaerob: gelb: unmittelbar nach Dithionitzugabe; schwarz: 15 min Inkubation; dunkelgrau: 30 min Inkubation; grau: 45 min Inkubation; hellgrau: 60 min Inkubation. Anschließend wurde die Probe Luftsauerstoff ausgesetzt; Messungen wurden nach folgenden Zeiten durchgeführt: oliv: 5 min Inkubation; gelbgrün: 15 min Inkubation; orange: 20 min Inkubation; braun: 30 min Inkubation.

Gibt man  $\text{NADP}^+$  zu oxidiertem FdRA, so erhält man ein Spektrum, das nicht von dem der oxidierten FdRA zu unterscheiden ist. Reduziert man die Mischung mit Dithionit (30x Überschuss), so beobachtet man eine zeitabhängige Abnahme des Absorptionsmaximums bei 448 nm. Signale, die auf die Bildung eines CT Komplexes zwischen  $\text{FdRA}_{\text{red}}$  und  $\text{NADP}^+$  schließen lassen, treten nicht auf. Bei Kontakt der Probe mit Luftsauerstoff hingegen zeigt sich nach kurzer Zeit eine weitere Abnahme des Maximums der oxidierten Form verbunden mit dem Auftreten eines deutlichen Signals im langwelligen Bereich ( $>750$  nm). Etwas schwächer ausgeprägt, aber dennoch erkennbar, ist das CT1 Signal bei 600 nm. Einmal gebildet, ändern sich die Spektrenform sowie die Signalstärke der CT Komplexe kaum über die Zeit (Abbildung 3.4.1.2D). Dies deutet darauf hin, dass das Vorhandensein von  $\text{NADP}^+$  die FdRA vor dem bei dem Dithionitansatz beobachteten Effekt schützt.



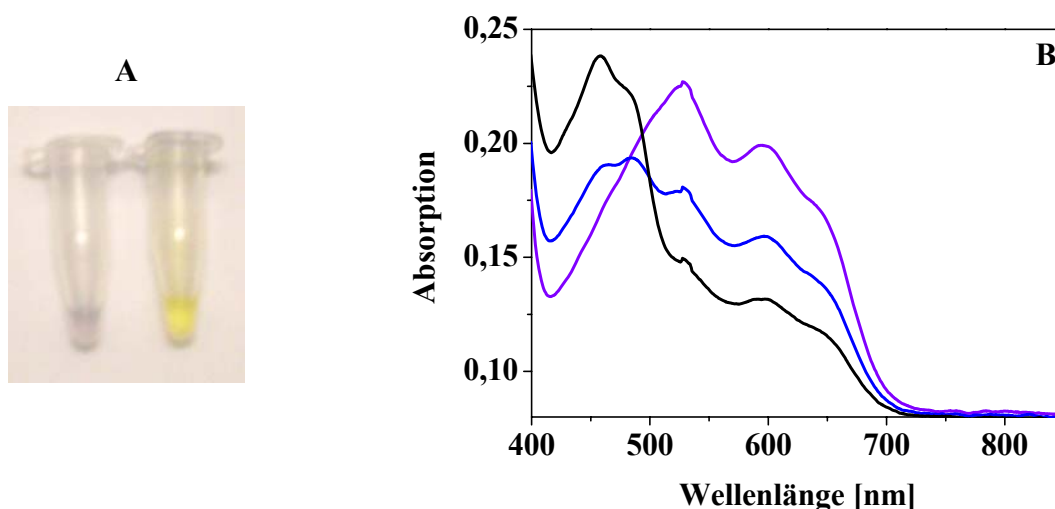
**Abbildung 3.4.1.2D: Reduktion der *S. cellulorum* So ce56 FdRA mit Dithionit in Anwesenheit von  $\text{NADP}^+$  und Reaktion mit Luftsauerstoff**

Gezeigt wird die zeitabhängige Reduktion der FdRA/  $\text{NADP}^+$  Mischung durch Dithionit unter anaeroben Bedingungen sowie die Bildung von CT Komplexen bei Kontakt mit Luftsauerstoff. Es fällt auf, dass das CT2 Signal stärker als das CT1 Signal ist. Das Verhältnis von  $\text{NADP}^+$  : FdRA betrug 10 : 1, das Verhältnis von Natriumdithionit : FdRA ca. 30 : 1. Die gezeigten Spektren wurden unter anaeroben Bedingungen oder unter aeroben Bedingungen aufgenommen. Die Probe enthielt 53  $\mu\text{M}$  FdRA in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, die Schichtdicke der Küvette betrug 1cm. Die Spektren stellen folgende Zustände dar: Anaerob: gelb: FdRA und  $\text{NADP}^+$ ; grau: 5 min nach Dithionitzugabe; schwarz: 15 min Inkubation; dunkelgrau: 30 min Inkubation. Nach Kontakt mit Luftsauerstoff wurden folgende Spektren aufgezeichnet: blaugrün: 5 min Inkubation; oliv: 15 min Inkubation; grün: 20 min Inkubation; gelbgrün: 30 min Inkubation.

### 3.4.1.3. UV/Vis-Spektroskopie der FdRB bei Reduktion

Wenn man zur putativen Ferredoxin Reduktase FdRB NADPH hinzugibt, schlägt die gelbe Farbe des Proteins in einen blau-violetten Farbton um (Abbildung 3.4.1.3A). Dieser Farbumschlag ist sowohl bei Zugabe des Reduktionsmittels unter aeroben Bedingungen als auch unter anaeroben Bedingungen zu beobachten.

Abbildung 3.4.1.3B zeigt die Entwicklung des FdRB-Spektrums bei Reduktion mit NADPH und der anschließenden Reoxidation durch Luftsauerstoff. Bei der anaerob reduzierten Probe ist das durch den oxidierten Chromophor hervorgerufene charakteristische Absorptionsmaximum bei 457 nm verschwunden; stattdessen treten zwei neue Maxima bei 527 nm und 597 nm sowie eine Schulter bei etwa 650 nm auf; es kann daher davon ausgegangen werden, dass FdRB unter den gewählten Bedingungen fast vollständig als blaues Semichinon vorliegt. Bei Kontakt mit Luftsauerstoff ist zu beobachten, wie die Probe langsam wieder ihre ursprüngliche gelbe Färbung annimmt. Entsprechend ist bei den UV/Vis-Spektren zu sehen, wie die für die Semichinonform typischen Maxima in ihrer Intensität abnehmen und gleichzeitig das für die oxidierte FdRB typische Maximum bei 457 nm wieder erscheint. Hinweise auf die Bildung von CT Komplexen liefern die erhaltenen Spektren nicht.

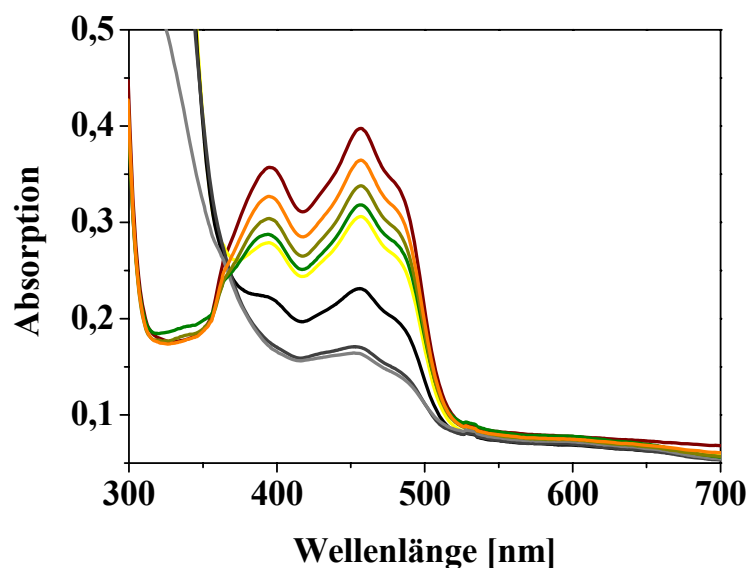


**Abbildung 3.4.1.3A: Oxidierte FdRB (rechts, gelb) im Vergleich zu mit NADPH behandelter FdRB (links, blau-violett)**

**Abbildung 3.4.1.3B: Reduktion der *S. cellulorum* So ce56 FdRB mit NADPH und anschließende Reoxidation**

FdRA wurde durch Zugabe von NADPH in 10x Überschuss unter anaeroben Bedingungen partiell reduziert (violett). Anschließend wurde die Reoxidation der Probe durch Kontakt mit Luftsauerstoff verfolgt, indem Spektren nach 5 min (blau) bzw. nach 25 min (schwarz) an der Luft gemessen wurden. Die Probe enthielt 54  $\mu$ M FdRB in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, die Schichtdicke der Küvette betrug 1cm.

Die Zugabe von Natriumdithionit im Überschuss zu FdRB unter anaeroben Bedingungen resultierte in einem Ausbleichen der Probe. Wie aus Abbildung 3.4.1.3C hervorgeht, war eine deutliche Abnahme der typischen Absorptionsmaxima bei 388 nm und 457 nm zu beobachten. Auffällig ist dabei, dass die Reduktion relativ langsam erfolgte; während der ersten 15 min nach Dithionitzugabe ist eine deutliche Abnahme der Maxima zu sehen. Danach scheint der Zustand der Probe unter anaeroben Bedingungen konstant zu bleiben, da sich die Spektren nach 15 min und nach 30 min Inkubation mit Dithionit unter Ausschluss von Luftsauerstoff kaum unterscheiden. Bringt man das reduzierte Protein in Kontakt mit Luft, so ist eine zeitabhängige Reoxidation zu beobachten. Im Gegensatz zu NADPH führt Natriumdithionit als Reduktionsmittel weder bei der Reduktion noch während der Reoxidation zur Bildung eines Semichinons.



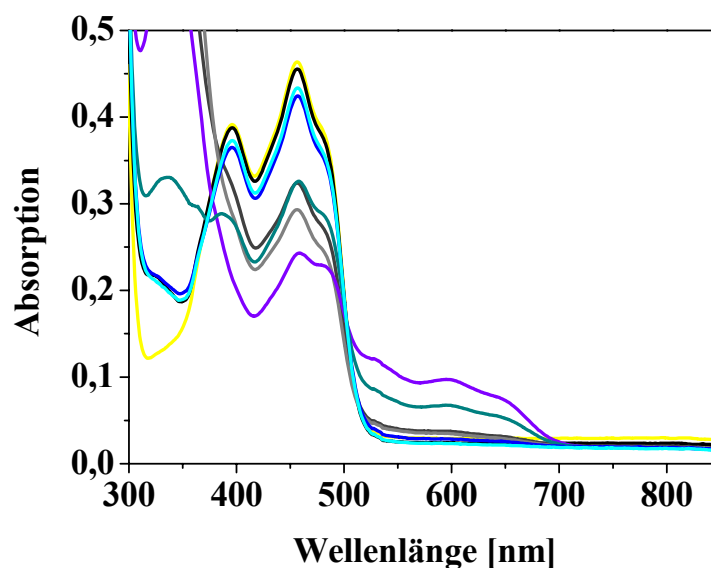
**Abbildung 3.4.1.3C: Reduktion der *S. cellulosum* So ce56 FdRB mit Dithionit und anschließende Reoxidation**

Das Verhältnis von Natriumdithionit : FdRB betrug ca. 27 : 1. Die gezeigten Spektren wurden unter anaeroben Bedingungen oder unter aeroben Bedingungen aufgenommen. Die Probe enthielt 54  $\mu$ M FdRB in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, die Schichtdicke der Küvette betrug 1cm. Es wurden folgende Messungen durchgeführt:

Anaerob: gelb: unmittelbar nach Dithionitzugabe; schwarz: 5 min Inkubation; dunkelgrau: 15 min Inkubation; grau: 30 min Inkubation. Anschließend erfolgte die Reoxidation der Probe durch Luftsauerstoff; Messungen wurden nach folgenden Zeiten durchgeführt: grün: 15 min Inkubation; gelbgrün: 30 min Inkubation; orange: 60 min Inkubation; braun: 90 min Inkubation.



Gibt man zu einer Mischung von  $\text{NADP}^+$  und oxidiertes FdRB Natriumdithionit in 30x Überschuss, so ist unter anaeroben Bedingungen die Bildung geringer Mengen des blauen Semichinons zu beobachten. Unter diesen Bedingungen nimmt jedoch sowohl die Menge des oxidierten FdRB als auch die des Semichinons mit der Zeit ab. Außerdem beobachtet man nach 15 min das Auftreten eines starken Signals bei 340 nm, was auf die Bildung von NADPH schließen lässt. Wenn man die Probe in Kontakt mit Luftsauerstoff bringt, erfolgt fast augenblicklich ein Farbumschlag und die Probe wird blau-violett. Entsprechend weist auch das Spektrum ein deutliches Semichinonsignal auf (Abbildung 3.4.1.3D). Wie schon zuvor beobachtet, reoxidiert das Semichinon mit der Zeit wieder zum Chinon; auch das gebildete NADPH wird bei Sauerstoffkontakt rasch wieder verbraucht. Die Tatsache, dass das Semichinonsignal beim initialen Kontakt mit Sauerstoff sehr viel stärker ausgeprägt ist als unter anaeroben Bedingungen, weist darauf hin, dass es hauptsächlich bei der Reoxidation gebildet wird. Möglicherweise ist das zuvor beobachtete Semichinonsignal darauf zurückzuführen, dass in der anaeroben Probe noch kleine Mengen Restsauerstoff vorhanden waren.

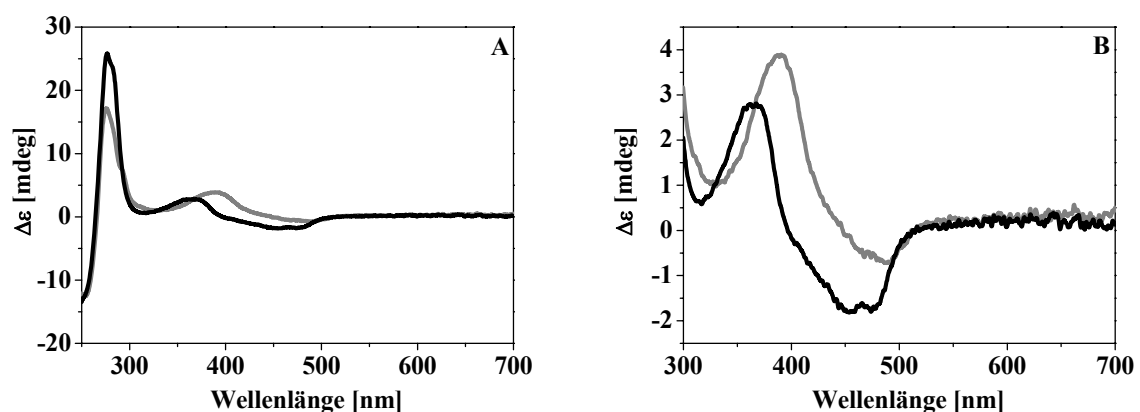


**Abbildung 3.4.1.3D: Reduktion der *S. cellulorum* So ce56 FdRB mit Dithionit in Anwesenheit von  $\text{NADP}^+$  und Reaktion mit Luftsauerstoff**

Die Reoxidation erfolgt unter Bildung des blauen Semichinons erfolgt. Das Verhältnis von  $\text{NADP}^+$  : FdRB betrug 10 : 1, das Verhältnis von Dithionit : FdRB 30 : 1. Die Probe enthielt 53  $\mu\text{M}$  FdRB in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, die Schichtdicke der Küvette betrug 1cm. Die Spektren wurden unter folgenden Bedingungen aufgezeichnet: Anaerob: gelb: FdRB und  $\text{NADP}^+$ ; schwarz: Dithionitzugabe; dunkelgrau: 5 min Inkubation; grau: 15 min Inkubation. Anschließend wurde die Probe in Kontakt mit Luftsauerstoff gebracht und es wurden unter aeroben Bedingungen Messungen durchgeführt: violett: 5 min Inkubation; grünblau: 15 min Inkubation; blau: 20 min Inkubation; hellblau: 30 min Inkubation.

### 3.4.2. CD-Spektroskopie

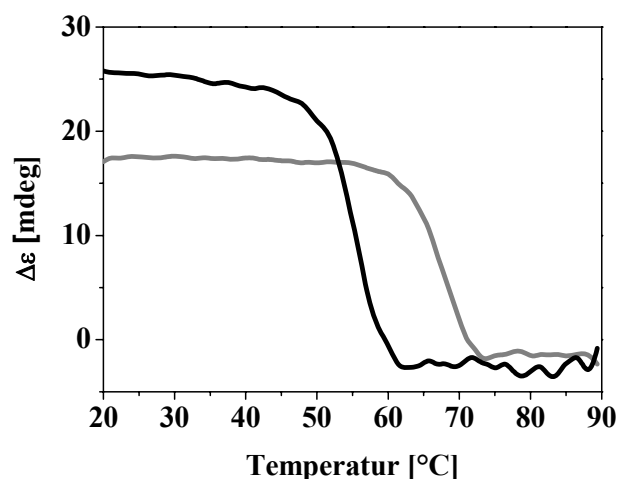
Die CD-Spektren der myxobakteriellen Flavoproteine FdRA und FdRB (Abbildung 3.4.2.1) ähneln in ihrer Form den Spektren der *E. coli* Flavodoxin Reduktase, der Spinat Ferredoxin Reduktase und der bovinen Adrenodoxin Reduktase (Hasumi *et al.*, 1982; Leadbeater *et al.*, 2000). Ihre charakteristischen Maxima sind in Tabelle 3.4.1 aufgeführt. Im nahen UV-Bereich (ca. 250 nm – 300 nm) tritt ein starkes positives CD-Signal auf, das dem für die *E. coli* Flavodoxin Reduktase beschriebenen Signal mit einem Maximum bei 272 nm entspricht (Leadbeater *et al.*, 2000). Im Fall der myxobakteriellen Reduktasen FdRA und FdRB liegen die Maxima bei 277 nm (FdRA) bzw. bei 276 nm (FdRB) (Abbildung 3.4.2.1A). Für die *E. coli* Flavodoxin Reduktase wurden zwei weitere charakteristische Banden im sichtbaren, für den oxidierten Flavinchromophor typischen Bereich (ca. 300 nm – 500 nm) beschrieben (Munro *et al.*, 1999): zum einen ein positives Signal, das seine höchste Intensität bei 388 nm erreicht, und zum anderen ein etwas schwächer ausgeprägtes negatives Signal mit einem Minimum bei 454 nm. Die Spektren von FdRA und FdRB zeigen einen ähnlichen Verlauf. Bei FdRA liegt das charakteristische lokale Maximum bei 368 nm und das Minimum bei 454 nm. Das Spektrum der FdRB zeigt ein lokales Maximum bei 388 nm und ein Minimum bei 489 nm. Diese Verschiebung des CD-Spektrums der FdRB gegenüber dem der FdRA im sichtbaren Bereich stimmt mit der bathochromen Verschiebung der Flavinsignale, die in der UV/Vis-Spektroskopie beobachtet wurde (Abbildung 3.4.1.1), überein.



**Abbildung 3.4.2.1: CD-Spektren der *S. cellulosum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen FdRA (schwarze Linie) und FdRB (graue Linie)**

Die Proben enthielten jeweils ca. 100  $\mu$ M Protein. Abbildung 3.4.2.1B ist eine vergrößerte Darstellung der CD-Signale aus 3.4.2.1A in der Region von 300 nm bis 700 nm, die auf die Flavinkomponente und ihre Umgebung zurückzuführen sind.

Die Änderung des CD-Signals in Abhängigkeit von der Temperatur wurde als Maß für strukturelle Änderungen der Proteine infolge thermischer Denaturierung aufgezeichnet (Abbildung 3.4.2.2), um die Halbumwandlungstemperatur  $T_m$  der beiden Flavoproteine zu bestimmen (Tabelle 3.4.2). Für beide Proteine wurde eine Wellenlänge im nahen UV-Bereich gewählt. Das dort beobachtete stark positive Signal geht hauptsächlich auf das Vorhandensein aromatischer Aminosäuren zurück, d.h. die so bestimmte  $T_m$  gibt Aufschluss über die Thermostabilität der Proteine insgesamt. Interessanterweise liegt die Halbumwandlungstemperatur von FdRA mit 55,3°C fast 12°C unter der von FdRB (67,1°C). FdRA ähnelt damit bezüglich seiner Thermostabilität Fdx1, für das eine Halbumwandlungstemperatur von 51,1°C bestimmt wurde. Die Halbumwandlungstemperatur von FdRB hingegen liegt unerwartet hoch und in dem Bereich der Ferredoxine Fdx2, Fdx3 und Fdx8 (64,5 °C – 69,0 °C). Damit ähnelt die Halbumwandlungstemperatur der FdRB auch den Werten, die für die *E. coli* Flavodoxin Reduktase (66°C, (Jarrett und Wan, 2002)) oder die Spinat Ferredoxin Reduktase (66,3°C, (Hasumi *et al.*, 1982)) beschrieben wurden.



**Abbildung 3.4.2.2: Schmelzkurven der *S. cellulosum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen FdRA (schwarz) und FdRB (grau)**

**Tabelle 3.4.2: Thermische Denaturierung der Ferredoxin Reduktasen aus *S. cellulosum* So ce56**

Die Änderung des CD-Signals bei einem Temperaturanstieg von 1°C/min im Bereich von 20°C bis 90 °C wurde bei einer für das jeweilige Protein geeigneten Wellenlänge verfolgt. Die Halbumwandlungstemperatur  $T_m$  wurde mit dem Programm „SigmaPlot 2001“ bestimmt.

Protein	Wellenlänge [nm]	Temperaturbereich [°C]	Halbumwandlungstemperatur $T_m$ [°C]
FdRA	277	20-90	55,3
FdRB	276	20-90	67,1

### 3.4.3. ESR-Spektroskopie

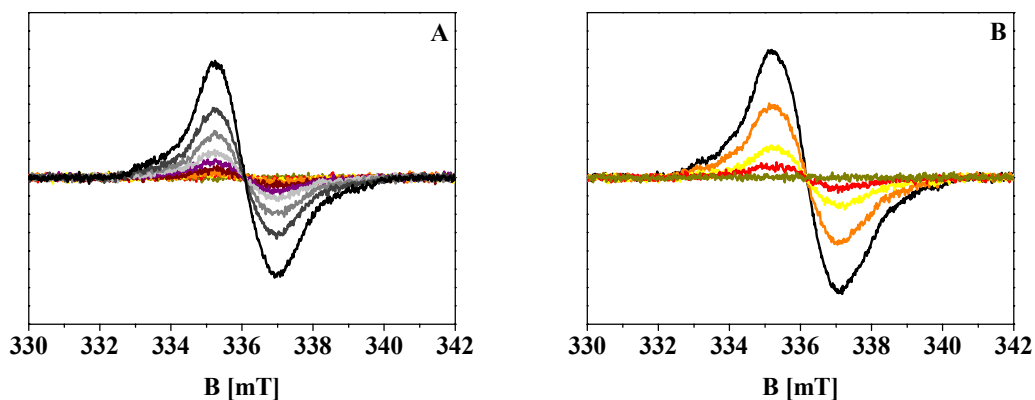
Flavoproteine können in der ESR nur in ihrer Semichinonform nachgewiesen werden, da sowohl die vollständig oxidierte Chinonform als auch die vollständig reduzierte Hydrochinonform über kein ungepaartes Elektron verfügen und daher diamagnetisch und in der ESR nicht detektierbar sind.

Sowohl FdRA als auch FdRB bilden stabile Semichinonradikale, wenn den Proben NADPH oder NADH zugegeben wird (Abbildung 3.4.3.1 und Abbildung 3.4.3.2). Die Semichinone beider Proteine weisen einen apparenten g-Faktor von 2,004 (Tabelle 3.4.1) auf, der sehr gut sowohl mit dem g-Faktor von freiem FAD ( $g = 2,0041$ ) als auch mit dem g-Faktor der Spinat Ferredoxin Reduktase ( $g = 2,0042$ ) übereinstimmt (Huang *et al.*, 1969). Allerdings sollte erwähnt werden, dass FdRA und FdRB Unterschiede in ihrem Reduktionsverhalten aufwiesen. Obwohl beide sowohl mit NADH als auch mit NADPH reduziert werden konnten, waren die Konzentrationen, die benötigt wurden, um das Semichinonsignal beobachten zu können, unterschiedlich. Bei FdRB genügten äquimolare Konzentrationen der Pyridinnukleotide um ein detektierbares Signal zu erhalten; die Signalintensität konnte allerdings durch weitere Zugabe des Reduktionsmittels verstärkt werden. Bei FdRA hingegen konnte ein Signal erst nachgewiesen werden, wenn NAD(P)H im Überschuss zugegeben wurde. Erst bei einem 4x molaren Überschuss an NADPH war ein schwaches Signal detektierbar, dessen Signalstärke allerdings wie im Fall des anderen Flavoproteins auch durch weitere Zugabe von NADPH erhöht werden konnte. Zur Bildung des Semichinons mit NADH musste das Verhältnis von Reduktionsmittel zu FdRA noch weiter erhöht werden. Erst bei einem 11x molaren Überschuss an NADH konnte überhaupt ein sehr schwaches Signal detektiert werden; um ein deutliches Signal zu erhalten wurde festes NADH zugegeben.

Da sich die charakteristischen Linienbreite der ESR-Spektren von neutralen (19 G) und anionischen (14-15G) Semichinonen unterscheiden (Murataliev, 1999), kann die ESR dazu verwendet werden, die Art des gebildeten Semichinons zu bestimmen. Dies ist besonders wichtig, wenn eine genaue Zuordnung des Semichinons mittels UV/Vis-Spektroskopie nicht möglich ist, sei es wegen einer spektralen Überlagerung durch andere prosthetische Gruppen wie Fe-S Cluster oder Häm oder aber durch die Bildung eines *Charge Transfer* Komplexes, der insbesondere die Detektion des neutralen, blauen Semichinons behindert. Im Fall der FdRB konnte das Ergebnis aus der UV/Vis-Spektroskopie bestätigt werden, dass durch Zugabe von NADPH zu dem oxidierten Protein ein neutrales Semichinon mit einer charakteristischen Linienbreite von 19 G entsteht (Abbildung 3.4.3.3). Außerdem wurde wie

bereits erwähnt gezeigt, dass die Semichinonbildung sowohl mit NADPH als auch mit NADH erfolgt; die Art des primären Elektronendonors hat dabei, wie zu erwarten, keine Auswirkung auf die Linienbreite. Eine Reduktion mit Dithionit hingegen führt offenbar nicht zur Semichinonbildung, da mit der so behandelten Probe kein ESR-Signal detektierbar war.

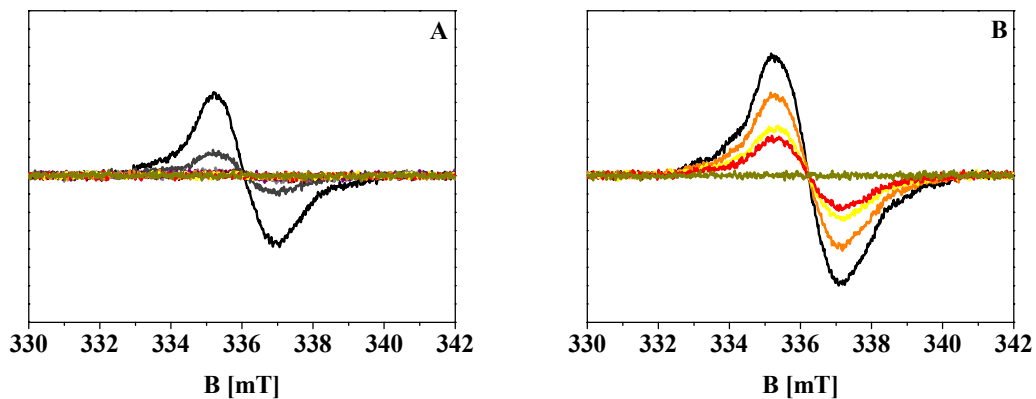
Auch für FdRA konnte mittels ESR das Vorhandensein eines neutralen Semichinons mit einer etwas geringeren Linienbreite von 17,5 G (Abbildung 3.4.3.3) gezeigt werden. Ebenso wie bei FdRB hatte die Art des eingesetzten Pyridinnukleotides keinen Einfluss auf die Linienbreite. Interessanterweise bildet nicht nur die Spinat Ferredoxin Reduktase (Linienbreite: 20 G), sondern auch die Adrenodoxin Reduktase aus Säugetieren (Linienbreite: 18 G) und ihr mycobakterielles Homolog FprA, die beide Teil von Klasse I Cytochrom P450 Systemen sind, ein neutrales Semichinon (Kitagawa *et al.*, 1982; McLean *et al.*, 2003; McLean *et al.*, 2006).



**Abbildung 3.4.3.1: ESR-Spektren der Semichinone der Ferredoxin Reduktasen aus *S. cellulosum* So ce56 bei Titration mit NADPH**

Abbildung 3.4.3.1A zeigt die Spektren, die durch Titration der FdRA mit NADPH erhalten wurden: gelbgrün: oxidierte FdRA; rot: NADPH/FdRA = 0,5; gelb NADPH/FdRA = 1; orange: NADPH/FdRA = 2; braun: NADPH/FdRA = 4; lila: NADPH/FdRA = 6; hellgrau: NADPH/FdRA = 11; grau, dunkelgrau und schwarz: sukzessive Zugabe von festem NADPH

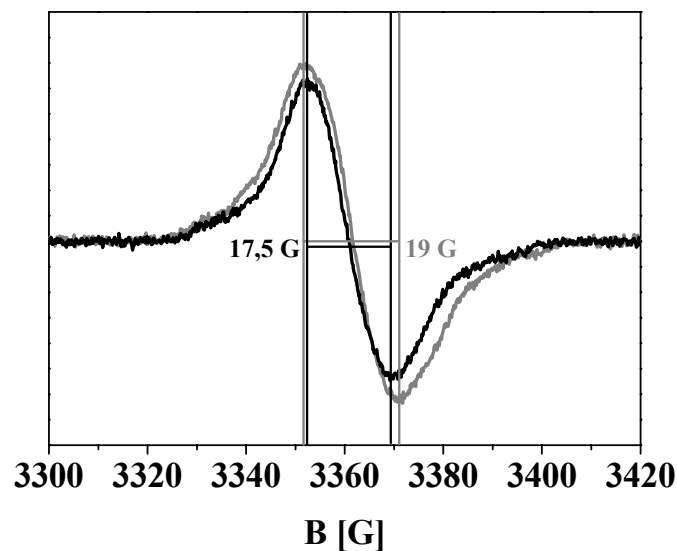
Abbildung 3.4.3.1B zeigt die Spektren, die durch Titration der FdRB mit NADPH erhalten wurden: gelbgrün: oxidierte FdRB; rot NADPH/FdRB = 0,5; gelb: NADPH/FdRB = 1; orange: NADPH/FdRB = 2; schwarz: Zugabe von festem NADPH.



**Abbildung 3.4.3.2: ESR-Spektren der Semichinone der Ferredoxin Reduktasen aus *S. cellulosum* So ce56 bei Titration mit NADH**

Abbildung 3.4.3.2A zeigt die Spektren, die durch Titration der FdRA mit NADH erhalten wurden: gelbgrün: oxidierte FdRA; rot: NADPH/FdRA = 0,5; gelb: NADPH/FdRA = 1; orange: NADPH/FdRA = 2; braun: NADPH/FdRA = 4; lila: NADPH/FdRA = 6; grau: NADPH/FdRA = 11, dunkelgrau und schwarz: sukzessive Zugabe von festem NADPH

Abbildung 3.4.3.2B zeigt die Spektren, die durch Titration der FdRB mit NADH erhalten wurden: gelbgrün: oxidierte FdRB; rot NADPH/FdRB = 0,5; gelb: NADPH/FdRB = 1; orange: NADPH/FdRB = 2; schwarz: Zugabe von festem NADPH.

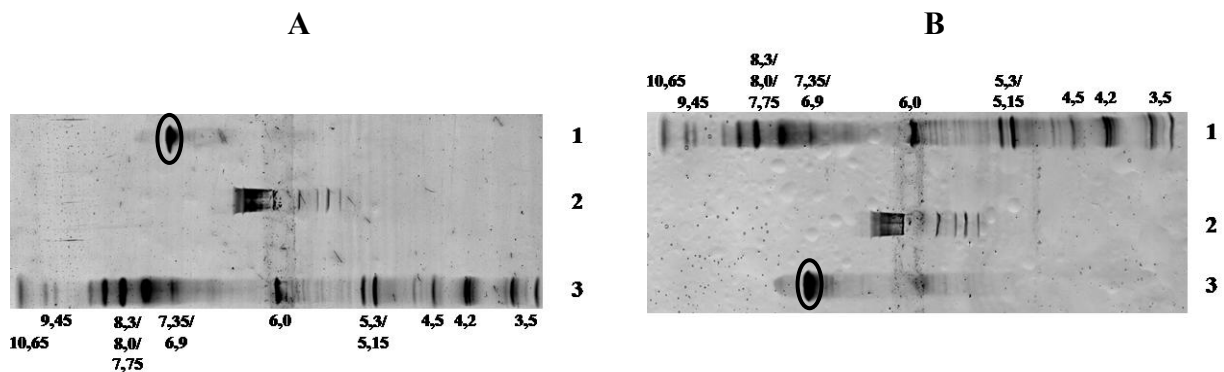


**Abbildung 3.4.3.3: Linienbreite der Semichinone der *S. cellulosum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen FdRA (schwarz) und FdB (grau)**

Die Messungen wurde bei einer Temperatur von 70 K, einer Mikrowellenleistung von 0,02 mW, einer Modulationsamplitude von 1G und einer Zeitkonstante von 20 ms durchgeführt. Die Proben enthielten jeweils 150  $\mu$ M Protein in 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4.

### 3.4.4. Isoelektrische Fokussierung der *S. cellulorum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB

Ebenso wie bei den Ferredoxinen, sollte auch bei den beiden Flavoproteinen FdRA und FdRB der vorhergesagte theoretische pI durch isoelektrischen Fokussierung der nativen Proteine überprüft werden. Es wurden jeweils mehrere Proben auf unterschiedlichen Gelen aufgetragen. Zwei Beispiele sind in Abbildung 3.3.4 dargestellt. Die durch Vergleich mit dem IEF Marker erhaltenen pI-Werte der einzelnen Proben jedes Proteins wurden anschließend gemittelt.



**Abbildung 3.3.4: Isoelektrische Fokussierung der *S. cellulorum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB**

A) 1: FdRB; 2: FdRA; 3: Marker. B) 1: Marker; 2: FdRA; 3: FdRB.

Der IEF-Marker enthält folgende Proteine: Amyloglucosidase (pI 3,5); Glucoseoxidase (pI 4,2); Trypsininhibitor (pI 4,5); ( $\beta$ -Lactoglobulin (pI 5,15/5,3); Carboanhydrase (pI 6,0); Myoglobin (Pferd, pI 6,9/7,35); Lentillectin (pI 7,75/8,0/8,3); Ribonuklease A (pI 9,45); Cytochrome c (pI 10,65).

Der dadurch experimentell für FdRB erhaltene Wert von  $7,05 \pm 0,13$  ( $n = 4$ ) weicht um fast 1 pH Einheit vom theoretische pI der *His<sub>6</sub>-getaggt* FdRB von 8,03 ab. Obwohl sich der pI der FdRB damit im neutralen anstatt im basischen Bereich befindet, kann daraus nicht geschlossen werden, dass FdRB nicht als Ferredoxin Reduktase in einem Cytochrom P450 System agieren und mit einem normalerweise negativ geladenen, d.h. sauren Ferredoxin wechselwirken kann. Tatsächlich weist eine der am besten untersuchten Klasse I Ferredoxin Reduktasen, die bovine Adrenodoxin Reduktase, ebenfalls einen experimentell ermittelten pI von  $\sim 7$  auf (Suhara *et al.*, 1982; Ziegler *et al.*, 1999).

Für FdRAhis wurde ein schwach saurer pI von 6,36 vorhergesagt. Experimentell war es nicht möglich, einen genauen pI zu bestimmen, da bei allen untersuchten FdRA Proben (n = 6) mehrere Banden bzw. ein Proteinschmier auftraten, die auf das Vorhandensein unterschiedlicher Faltungen bzw. Modifikationen zurückzuführen sein könnten. Legt man aber den pH-Bereich mit dem stärksten Signal (d.h. mit der höchsten Proteinkonzentration: pH ~ 6,3 - 6,4) zugrunde, so kann der theoretische pI bestätigt werden.

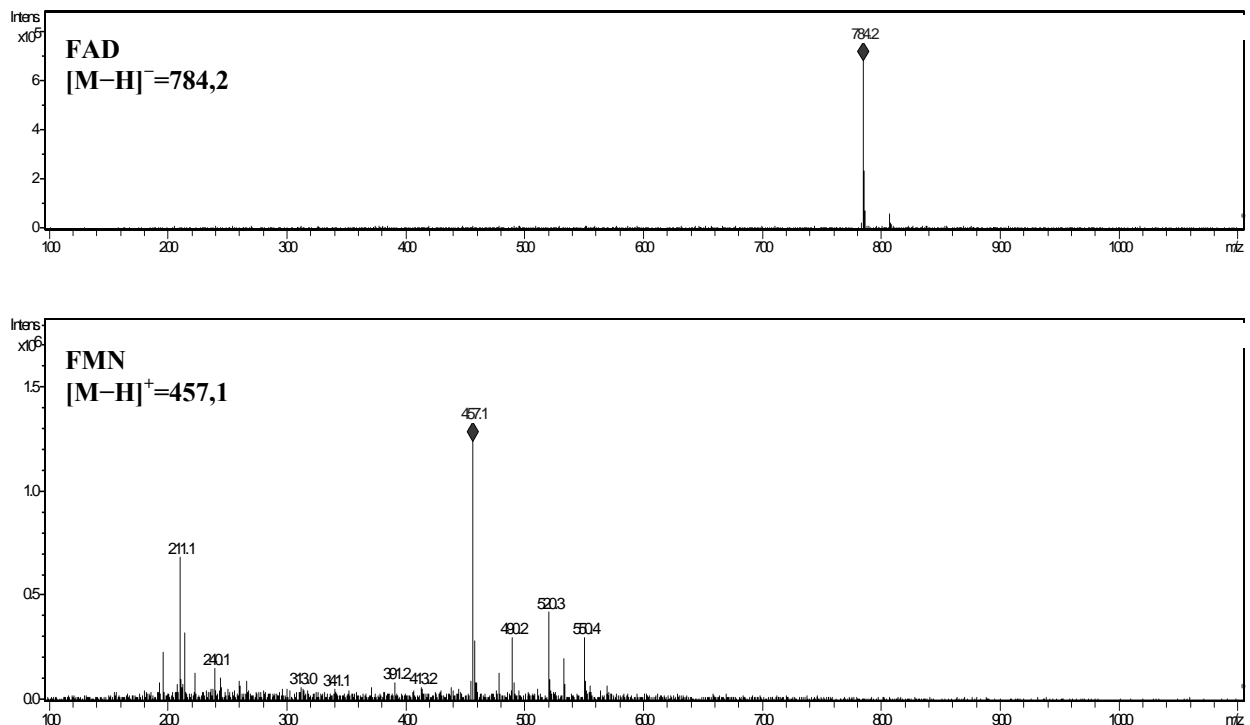


### 3.4.5. Untersuchung der prosthetischen Gruppe der *S. cellulosum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB

#### 3.4.5.1. Identifikation der Flavinkomponente

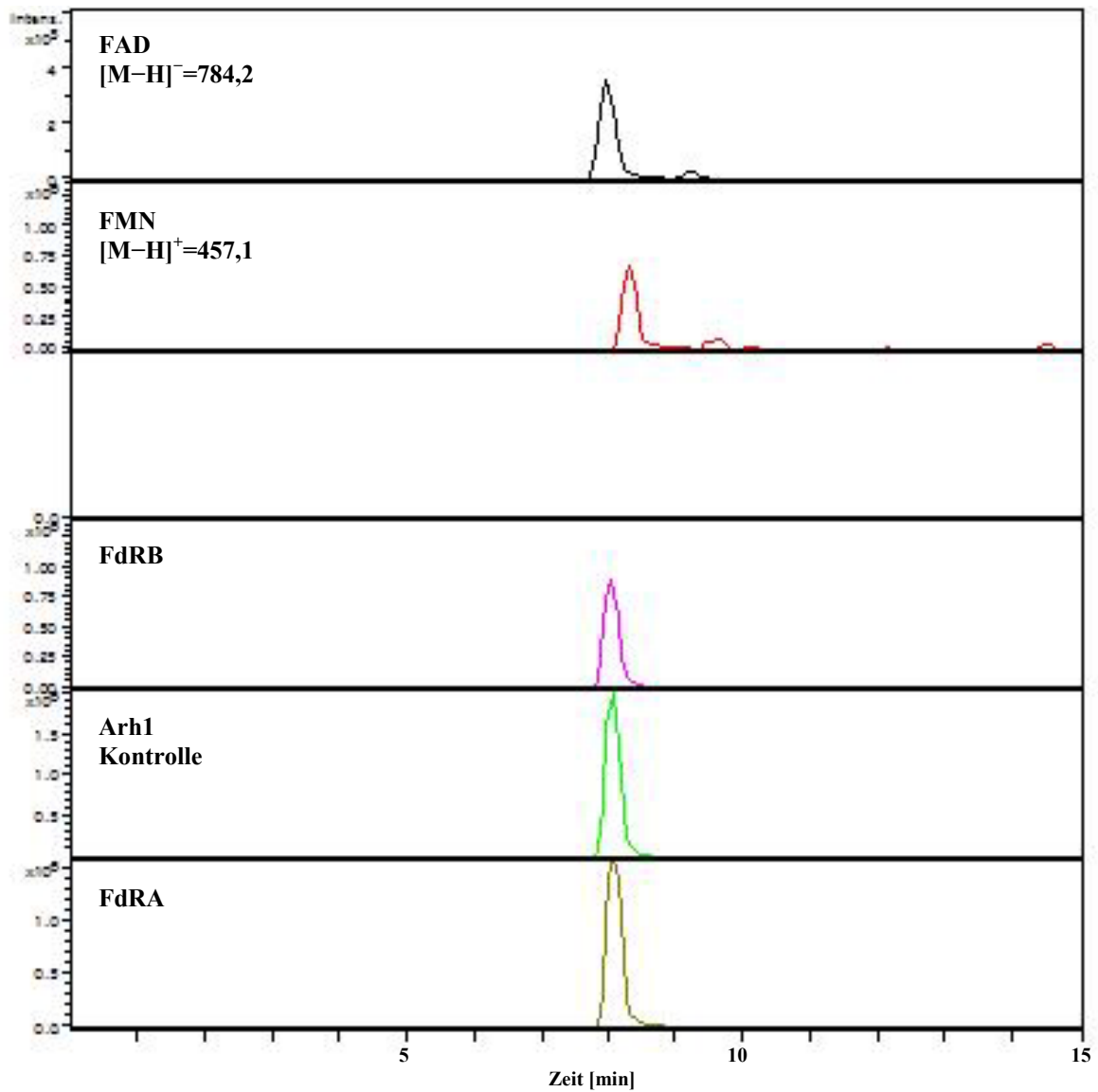
Da Ferredoxin Reduktasen normalerweise FAD als prosthetische Gruppe enthalten, sollte auch für die myxobakteriellen Flavoproteine FdRA und FdRB bestimmt werden, ob es sich bei der Flavinkomponente um FAD oder FMN handelt. Dazu wurden die beiden Proteine denaturiert und der flavinhaltige Überstand einer LC-MS Messung unterzogen. Die Tatsache, dass das Flavin einfach durch Zugabe eines organischen Lösungsmittels bzw. durch Erhitzen aus dem Protein herausgelöst werden konnte, beweist, dass in beiden Flavoproteinen die prosthetische Gruppe nicht-kovalent gebunden ist.

Sowohl für FdRA als auch für FdRB zeigten die LC-MS Messungen einen einzigen Peak mit einem Molekulargewicht von 784,2 bei 8,0 Minuten (Abbildung 3.4.5.1.2:). Die Retentionszeit sowie das Molekulargewicht der beiden Flavinproben stimmen somit mit den Werten der FAD-Kontrolle überein.



**Abbildung 3.4.5.1.1: Massenspektren der Referenzproben FAD und FMN**

FAD wurde im negativen Ionisierungsmodus  $[M-H]^- = 784,2$  (bei 8,0 min) und FMN im positiven Ionisierungsmodus  $[M+H]^+ = 457,1$  (bei 8,3 min) detektiert.

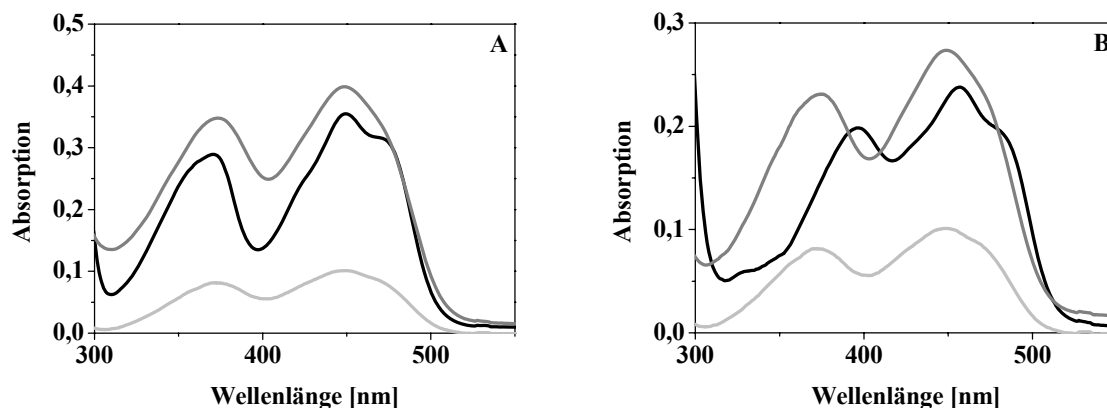


**Abbildung 3.4.5.1.2: EICs (Extracted Ion Chromatograms) der LC-MS Analyse der Flavinproben**

FAD (schwarz) zeigt eine Retentionszeit von 8,0 Minuten, FMN (rot) von 8,3 Minuten. Die drei Proteinproben FdRA (gelb), FdRB (pink) und Arh1 (grün) zeigen alle einen Peak bei 8,0 Minuten. Bei Arh1 handelt es sich um das Homolog der Adrenodoxin Reduktase aus *S. pombe*, das wie diese als prosthetische Gruppe ein FAD enthält (Ewen *et al.*, 2008).

### 3.4.5.2. Bestimmung des FAD Gehaltes

Um den FAD Gehalt der *S. cellulorum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB zu bestimmen, wurden UV/Vis-Spektren vor und nach thermischer Denaturierung der Proteine aufgezeichnet (Abbildung 3.4.5.2). Die Signale nach der Hitzebehandlung entsprechen in ihrer Form denen der FAD Kontrolllösung; bei beiden Proteinen ist die ausgeprägte Schulter nicht mehr zu sehen. Bei FdRB fällt außerdem die Verschiebung der flavinbedingten Maxima auf.



**Abbildung 3.4.5.2: Bestimmung des FAD Gehaltes der *S. cellulorum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB mittels UV/Vis-Spektroskopie**

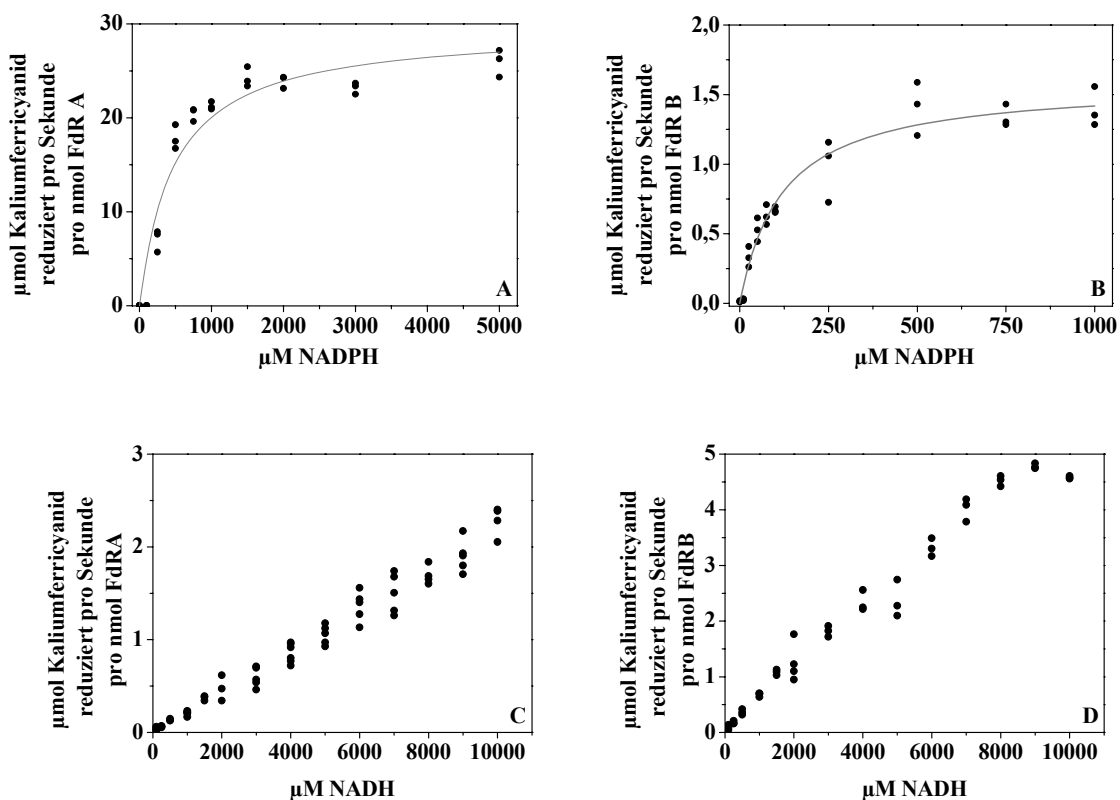
Abbildung 3.4.5.2 A zeigt das Spektrum der FdRA vor (schwarz) bzw. nach (grau) der Hitzenaturierung, sowie das Spektrum einer 10 µM FAD Kontrolllösung (hellgrau).

Abbildung 3.4.5.2 B zeigt das Spektrum der FdRB vor (schwarz) bzw. nach (grau) der Hitzenaturierung, sowie das Spektrum einer 10 µM FAD Kontrolllösung (hellgrau).

Die mithilfe der jeweiligen Extinktionskoeffizienten bestimmte Konzentrationen der Proteine und des freien FAD wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt, um den prozentualen Anteil an Holoprotein zu berechnen. Für FdRA wurde ein Wert von  $96,7 \pm 12,1 \%$  ( $n = 3$ ) erhalten, für FdRB  $89,9 \pm 6,0 \%$  ( $n = 3$ ). Somit kann davon ausgegangen werden, dass der überwiegende Anteil der *S. cellulorum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB als Holoprotein mit 1 mol FAD pro mol FdR vorliegt.

**3.4.6. Reaktion der *S. cellulorum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB mit NAD(P)H: Ferricyanid Assay**

Um die Affinität der *S. cellulorum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB zu NADPH und NADH zu bestimmen, wurde die Reduktion des artifiziellen Elektronenakzeptors Kaliumhexacyanoferrat in Abhängigkeit von der NAD(P)H Konzentration untersucht. Der ermittelte apparente  $K_m$  Wert für NADPH beträgt bei FdRA  $474 \mu\text{M} \pm 83 \mu\text{M}$  (Abbildung 3.4.6A) und bei FdRB  $120 \mu\text{M} \pm 17 \mu\text{M}$  (Abbildung 3.4.6B). Für NADH hingegen konnten keine  $K_m$  Werte bestimmt werden, da beide Ferredoxin Reduktasen selbst bei einer NADH Konzentration von 10 mM noch nicht im gesättigten Bereich waren (Abbildung 3.4.6C und D). Das deutet darauf hin, dass es sich um eine unspezifische Interaktion handelt, obwohl aus den ESR-Messungen bekannt ist, dass NADH generell in der Lage ist, sowohl FdRA als auch FdRB zu reduzieren.



**Abbildung 3.4.6: Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat in Abhängigkeit von der Konzentration an NADPH (A und B) und NADH (C und D)**  
 Die von der FdRA katalysierten Reaktionen sind in den Feldern A und C dargestellt, die durch FdRB katalysierten Reaktionen in den Feldern B und D.

### 3.5. Interaktion der Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen aus *S. cellulosum* So ce56 – Rekonstitution von CYP Klasse I Systemen

#### 3.5.1. Rekonstitution eines Cytochrom P450 Klasse I Systems mit CYP11A1

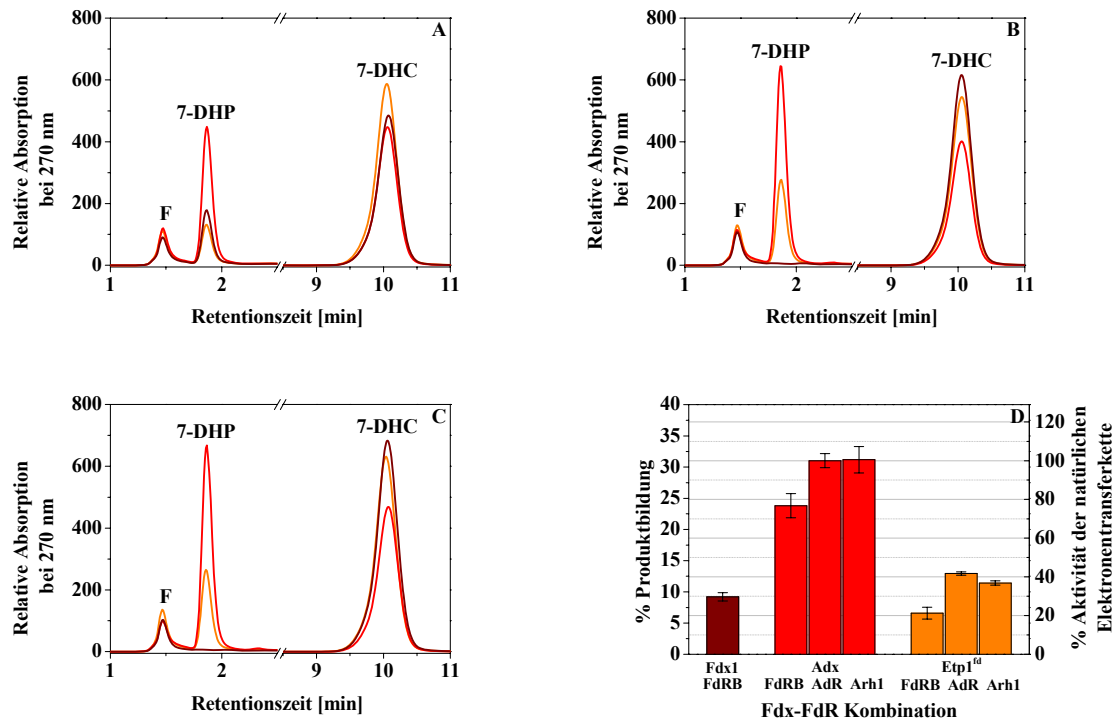
CYP11A1 (EC 1.14.15.6) ist ein Klasse I Cytochrom P450 des mitochondrialen Typs, das in der Nebennierenrinde von Säugetieren vorkommt und die aus drei Einzelschritten bestehende Reaktion von Cholesterol zu Pregnenolon katalysiert. Die Abspaltung der Cholesterolseitenkette ist der erste und gleichzeitig der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der adrenalen Steroidhormonbiosynthese (Bernhardt und Waterman, 2007). Als Klasse I Cytochrom P450 benötigt CYP11A1 eine Elektronentransferkette bestehend aus einem Ferredoxin und einer Ferredoxin Reduktase. Bei den natürlichen Interaktionspartnern des CYP11A1 handelt es sich um ein axiales [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxin und eine NADPH abhängige FAD-haltige Ferredoxin Reduktase, die aufgrund ihres Vorkommens in der Nebennierenrinde (adrenaler Kortex) als Adrenodoxin (Adx) bzw. Adrenodoxin Reduktase (AdR) bezeichnet werden. Es sollte untersucht werden, ob eine Elektronentransferkette bestehend aus myxobakteriellen Proteinen in der Lage ist, Adx und AdR in einem *in vitro* Rekonstitutionsassays mit bovinem CYP11A1 (UniProt Nummer P00189) und 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) als Substrat zu ersetzen. Jedes der fünf gereinigten myxobakteriellen Ferredoxine wurde sowohl in Kombination mit FdRA als auch mit FdRB getestet. Es zeigte sich, dass unter den gewählten Bedingungen nur bei einer Kombination myxobakterieller Ferredoxin Reduktasen und Ferredoxine, FdRB-Fdx1, das Produkt 7-Dehydropregnenolon (7-DHP) nachweisbar war (Abbildung 3.5.1A). Mit diesen beiden Proteinen wurden auch Kreuzreaktionen mit den Komponenten der Elektronentransferketten AdR-Adx und Arh1-Etp1<sup>fd</sup> durchgeführt. Bei der Kombination AdR-Adx handelt es sich, wie bereits erwähnt, um die natürliche Elektronentransportkette des CYP11A1, Arh1-Etp1<sup>fd</sup> hingegen ist eine Elektronentransferkette aus *S. pombe*, die zwar in der Lage ist, Elektronen auf CYP11A1 zu übertragen, deren natürliche Funktion jedoch in der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese vermutet wird (Ewen *et al.*, 2008). Von den Kombinationen AdR-Fdx1, Arh1-Fdx1, FdRB-Adx und FdRB-Etp1 zeigten nur die letzten beiden eine nachweisbare Aktivität im Rekonstitutionsassay, während in den Proben, die Kombinationen des Fdx1 mit einer der beiden eukaryotischen Reduktasen enthielten, kein Produkt detektierbar war (Abbildung 3.5.1A-C). Vergleicht man die Produktbildung in den unterschiedlichen Ansätzen (Tabelle 3.5.1 und Abbildung 3.5.1D), so stellt man fest, dass die Kombinationen mit dem natürlichen

Interaktionspartner des CYP11A1, dem Adx, am effizientesten waren. Adx kann dabei von allen drei verwendeten Ferredoxin Reduktasen reduziert werden. Wie bereits beschrieben ist das AdR Homolog aus *S. pombe*, Arh1, in der Lage, die AdR verlustfrei zu ersetzen (Ewen *et al.*, 2008), aber auch in Kombination mit der bakteriellen FdRB erreicht Adx über 76% der bei der natürlichen Elektronentransferkette beobachteten Produktbildung. Die Reaktionen, die Etp1<sup>fd</sup> als Ferredoxinkomponente enthielten, zeigten erwartungsgemäß (Schiffler *et al.*, 2004a; Ewen *et al.*, 2008) eine niedrigere 7-DHP-Bildung als die vergleichbaren Ansätze mit Adx. Ebenso wie Adx konnte auch Etp1<sup>fd</sup> mit allen drei Ferredoxin Reduktasen arbeiten, wobei mit AdR und Arh1 deutlich mehr Produkt gebildet wurde als in Kombination mit FdRB. Im Gegensatz zu Adx und Etp1<sup>fd</sup> ist Fdx1 offenbar auf die myxobakterielle Ferredoxin Reduktase angewiesen; das rein myxobakterielle System aus Fdx1 und FdRB erreicht einen Wert von rund 30 % der bei der natürlichen Elektronentransferkette beobachteten Produktbildung.

**Tabelle 3.5.1: Vergleich der Aktivität unterschiedlicher Ferredoxin-Ferredoxin Reduktase Kombinationen im *in vitro* Rekonstitutionsassays mit CYP11A1**

Dargestellt ist die prozentuale Produktbildung bzw. die prozentuale Aktivität des jeweiligen Systems bezogen auf die als 100% gesetzte Aktivität des endogenen Systems bestehend aus AdR-Adx. Für jede Kombination wurden drei Messungen durchgeführt.

Elektronentransportkette zu CYP11A1	Prozent Produktbildung	Prozent der Aktivität der natürlichen Elektronentransferkette
Fdx1-FdRB	9,2 ± 0,7	29,6 ± 2,1
Fdx1-AdR	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,2
Fdx1-Arh1	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1
Adx-FdRB	23,8 ± 1,9	76,8 ± 6,2
Adx-AdR	31,0 ± 1,1	100,0 ± 3,6
Adx-Arh1	31,2 ± 2,1	100,5 ± 6,8
Etp1 <sup>fd</sup> -FdRB	6,6 ± 0,9	21,2 ± 3,0
Etp1 <sup>fd</sup> -AdR	12,9 ± 0,3	41,7 ± 0,9
Etp1 <sup>fd</sup> -Arh1	11,4 ± 0,4	36,8 ± 1,1



**Abbildung 3.5.1: CYP11A1 katalysierter Substratumsatz in Abhängigkeit von unterschiedlichen Fdx-FdR Kombinationen**

Die Abbildungen 3.5.1A-C zeigen HPLC-Chromatogramme: Dargestellt sind die Kombinationen der Ferredoxine Fdx1 (braun), Adx (rot) und Etp1<sup>fd</sup> (orange) mit den Ferredoxin Reduktasen FdRB (A), AdR (B) und Arh1 (C). Die gezeigten Steroide sind das Substrat 7-Dehydrocholesterol (7-DHC), das Produkt 7-Dehydropregnenolon (7-DHP) und das als interner Standard verwendete Cortisol (F). Für den Umsatz wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt: 45 min bei 37 °C mit FdR : Fdx : CYP11A1 = 1 : 10 : 1.

In Abbildungen 3.5.1D wird die Produktbildung im CYP11A1 abhängigen Substratumsatz in Abhängigkeit von der verwendeten Elektronentransferkette verglichen: Dargestellt ist die prozentuale Produktbildung bzw. die prozentuale Aktivität des Systems in Bezug auf die natürliche Elektronentransferkette Adx-Adx.

### 3.5.2. Rekonstitution eines Cytochrom P450 Klasse I Systems mit CYP260A1

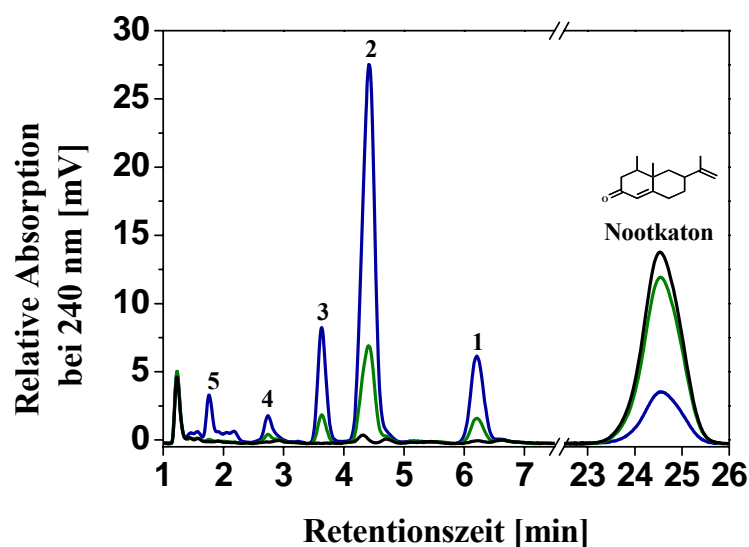
#### 3.5.2.1. CYP260A1 abhängige Umsetzung von Nootkaton

CYP260A1 (EC:1.14.-.-; UniProt Nummer: A9FDB7; Gen sce1588) ist eines von insgesamt einundzwanzig Cytochrom P450 Enzymen, die im Genom von *S. cellulosum* So ce56 identifiziert wurden (Khatri, 2009). CYP260A1 ist das erste Mitglied einer neu identifizierten Cytochrom P450 Familie. Die *in vivo* Funktion dieses Enzyms ist bislang unbekannt, aber *in vitro* kann der zu den bizyklischen Sesquiterpenen gehörende Aromastoff Nootkaton umgesetzt werden (Ewen *et al.*, 2009; Khatri, 2009). Daher wurde CYP260A1 als Testsystem gewählt, um zu überprüfen, welche der zehn möglichen Kombinationen der myxobakteriellen Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen in der Lage sind, als endogene Elektronentransferkette für CYP260A1 zu dienen. Es zeigte sich, dass zwei der Ferredoxine, die beiden [3Fe-4S]-Cluster Ferredoxine Fdx2 und Fdx8, in der Lage sind, effizient die katalytische Aktivität von CYP260A1 zu unterstützen. Wie aus Abbildung 3.5.2.1.1 ersichtlich ist, wird Nootkaton zu mindestens fünf hydrophileren Produkten umgesetzt. Das Hauptprodukt (Peak 2) weist eine Retentionszeit von 4,4 min auf und wird von zwei Nebenprodukten mit Retentionszeiten von 3,6 min (Peak 3) und 6,2 min (Peak 1) flankiert. In deutlich geringeren Mengen treten die beiden Produkte auf, die bei 2,8 min (Peak 4) und 1,8 min (Peak 5) eluieren. Das Produkt mit der geringsten Retentionszeit war nur in den Ansätzen, die FdRB als Flavoproteinkomponente enthielten, nachweisbar. Eine Untersuchung der Produkte mittels LC-MS wurde freundlicherweise von Dr. rer. nat. Daniel Krug (Arbeitsgruppe Prof. Dr. rer. nat. Rolf Müller, Institut für Pharmazeutische Biotechnologie) durchgeführt. Sie ergab, dass es sich um vier monohydroxylierte Produkte ( $[M+H]^+ = 235/m/z$ ) sowie ein dihydroxyliertes Produkt ( $[M+H]^+ = 251/m/z$ ) handelt (Abbildung 3.5.2.1.2). Da Substanzen unter den gewählten HPLC Bedingungen umso schneller eluieren, je hydrophiler sie sind, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem dihydroxylierten Produkt um Peak 5 handelt.

Wie aus Abbildung 3.5.2.1.3A hervorgeht, bevorzugt sowohl Fdx2 als auch Fdx8 die FdRB als Interaktionspartner gegenüber FdRA. Vergleicht man die Effizienz der vier Kombinationen unter den gewählten Bedingungen, so stellt man fest, dass die Gesamtproduktbildung in Prozent bei den beiden Kombinationen FdRB-Fdx2-CYP260A1 ( $76\% \pm 6$ ) und FdRB-Fdx8-CYP260A1 ( $65\% \pm 10$ ) fast identisch ist. Bei den Kombinationen, die als Flavoproteinkomponente FdRA enthielten, ist die Gesamtproduktbildung jedoch mit

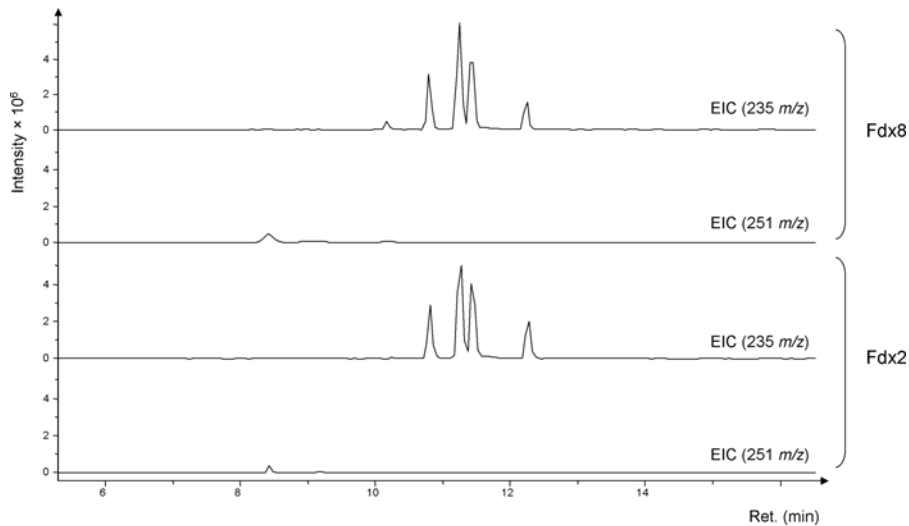


16 %  $\pm$  3 (Fdx2) bzw. mit 7 %  $\pm$  1 (Fdx8) drastisch reduziert. Neben den unterschiedlichen Kombinationen der myxobakteriellen Proteine wurden auch heterologe Kombinationen (alle myxobakteriellen Ferredoxine mit AdR, Adx-AdR, Adx-FdRA und Adx-FdRB) mit CYP260A1 getestet. Überraschenderweise zeigte sich, dass das bovine System nicht nur in der Lage ist, Elektronen auf CYP260A1 zu übertragen, sondern dass es diese Aufgabe sogar effizienter erfüllt als die endogenen Systeme (Abbildung 3.5.2.1.3B und Tabelle 3.5.2.1). Allerdings konnte auch mit der Kombination von Fdx8 und boviner AdR eine deutlich höhere Gesamtproduktbildung als im komplett myxobakteriellen System erreicht werden. Fdx2 hingegen scheint nur schlecht Elektronen von der AdR aufnehmen zu können; eine Produktbildung ist zwar nachweisbar, jedoch fällt sie mit 5,0 %  $\pm$  1,5 % im Vergleich zu den Kombinationen mit FdRA und FdRB deutlich geringer aus. Adx wiederum kann von beiden myxobakteriellen Reduktasen reduziert werden, wobei auch hier die Präferenz auf der FdRB liegt.



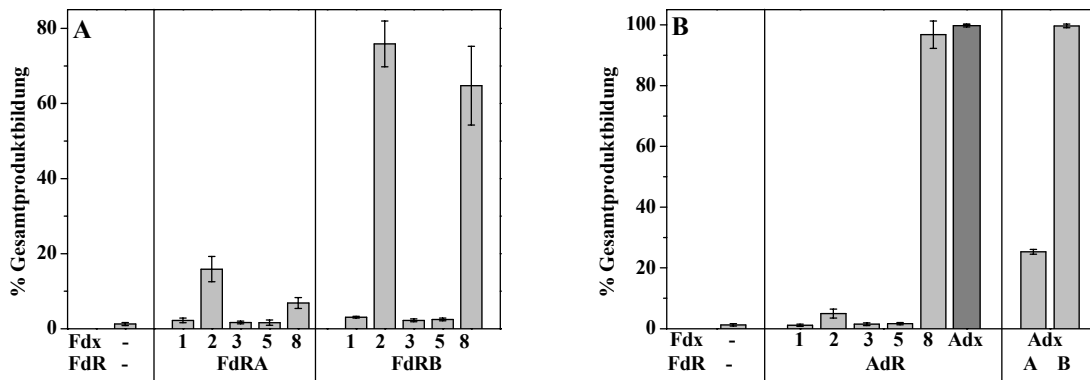
**Abbildung 3.5.2.1.1: HPLC Chromatogramme des *in vitro* Rekonstitutionsassays von CYP260A1 mit Fdx2 in Kombination mit FdRA oder FdRB**

Dargestellt sind die Kombinationen mit FdRA-Fdx2 (grün) und FdRB-Fdx2 (blau) sowie eine Negativkontrolle, bei der im Reaktionsansatz weder Ferredoxin noch Ferredoxin Reduktase enthalten war (schwarz). Der Peak bei 24,5 min ist der Aromastoff Nootkaton, die anderen, mit den Ziffern 1-5 gekennzeichneten Peaks sind die Reaktionsprodukte. Für den Umsatz wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt: 90 min bei 30 °C in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, mit FdR : Fdx : CYP260A1 = 8 : 80 : 1.



**Abbildung 3.5.2.1.2: EICs (Extracted Ion Chromatograms) der LC-MS Analyse der Produkte der Nootkaton Umsetzung**

Die Produktmuster der CYP260A1 abhängigen Umsetzung von Nootkaton mit FdRB-Fdx8 und FdRB-Fdx2 als Elektronentransferkette werden verglichen. Beide Proben enthalten mindestens vier monohydroxylierte Produkte mit  $[M+H]^+ = 235 \text{ m/z}$ . In beiden Proben wurden auch geringe Mengen eines vermutlich dihydroxylierten Produktes mit  $[M+H]^+ = 251 \text{ m/z}$  detektiert.



**Abbildung 3.5.2.1.3: Vergleich der CYP260A1 abhängigen Umsetzung von Nootkaton mit unterschiedlichen Kombinationen von Ferredoxinen und Ferredoxin Reduktasen**

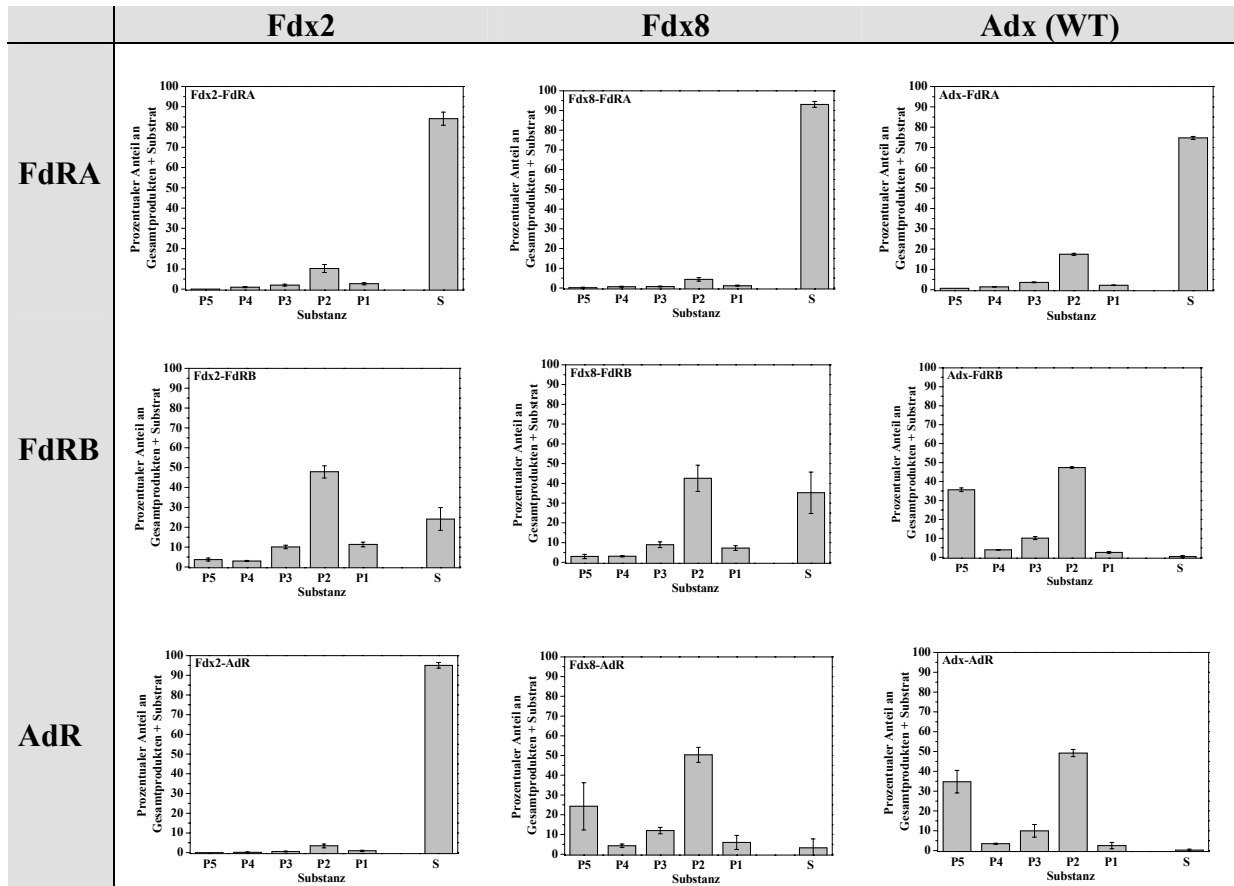
Die Gesamtproduktbildung (Summe der Produkte 1-5 zu Summe der Produkte und des Substrates) der CYP260A1 abhängigen Umsetzung von Nootkaton in Abhängigkeit von verschiedenen Fdx-FdR Kombinationen als Elektronentransportkette ist in Abbildung 3.5.2.1.3 dargestellt. Die Tatsache, dass auch in der Negativkontrolle (ohne Fdx und FdR) Spuren der Produkte auftreten ( $1,3 \% \pm 0,4$ ), kann auf den Zerfall bzw. Verunreinigungen des Substrates zurückgeführt werden. Abbildung 3.5.2.1.3A zeigt die Kombinationen der myxobakteriellen Ferredoxine mit FdRA bzw. FdRB, während in Abbildung 3.5.2.1.3B Systeme dargestellt sind, bei denen Ferredoxin und Ferredoxin Reduktase aus unterschiedlichen Ursprungsorganismen kombiniert wurden. Außerdem zeigt diese Abbildung die Kombination von Adx (Wildtyp, WT) mit AdR, die durch einen dunkleren Grauton hervorgehoben ist.

**Tabelle 3.5.2.1: Produktbildung im Test der CYP260A1 abhängigen Nootkaton Umsetzung mit unterschiedlichen Kombinationen von Ferredoxinen und Ferredoxin Reduktasen**

Gezeigt wird die Gesamtproduktbildung (in Prozent) der Reaktionsansätze mit verschiedenen Fdx-FdR Kombinationen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus der Zahl der in der letzten Spalte angegebenen Messungen.

Elektronentransportkette zu CYP260A1	Prozent Gesamtproduktbildung	Messungen n
Keine (Negativkontrolle)	1,3 ± 0,4	9
Fdx2-FdRA	15,9 ± 3,4	9
Fdx2-FdRB	75,9 ± 6,1	9
Fdx2-AdR	5,0 ± 1,5	9
Fdx8-FdRA	6,9 ± 1,5	9
Fdx8-FdRB	64,8 ± 10,5	9
Fdx8-AdR	96,8 ± 4,5	9
Adx-FdRA	25,3 ± 0,8	3
Adx-FdRB	99,7 ± 0,6	3
Adx-AdR	99,8 ± 0,5	9

Betrachtet man den jeweiligen Anteil der einzelnen Produkte (Abbildung 3.5.2.1.4), so fällt auf, dass die Menge des gebildeten Hauptproduktes P2 maximal bei etwa 50 % liegt. Wird kein oder nur wenig P5 detektiert, so sind die prozentualen Anteile an P1 und P3 relativ ähnlich. Wird das dihydroxylierte Produkt P5 jedoch in größeren Mengen (> 20%) gebildet, wie dies bei den auch hinsichtlich der Gesamtproduktbildung am effizientesten Kombinationen Adx-AdR, Adx-FdRB und Fdx8-AdR der Fall ist, ist der Anteil von P3 deutlich höher als der von P1.



**Abbildung 3.5.2.1.4: Vergleich der CYP260A1 abhängigen Umsetzung von Nootkaton mit unterschiedlichen Fdx-FdR Kombinationen: Prozentualer Anteil der einzelnen Produkte und des Restsubstrates**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Substanzen (Substanz zu Summe aller Produkte und des Substrates) bei unterschiedlichen Kombinationen von Ferredoxinen und Ferredoxin Reduktasen in der CYP260A1 abhängigen Umsetzung von Nootkaton. S ist das Substrat Nootkaton, P1-5 sind die Produkte. Die Retentionszeiten der Produkte waren wie folgt: P5: 1,8 min; P4: 2,8 min; P3: 3,6 min; P2: 4,4 min; P1: 6,2 min

3.5.2.2. NADPH Verbrauch der identifizierten myxobakteriellen Klasse I Systeme

Mithilfe des NADPH Verbrauchs sollten die vier Kombinationen myxobakterieller Proteine (Fdx2-FdRA, Fdx2-FdRB, Fdx8-FdRA, Fdx8-FdRB), die die katalytische Aktivität des CYP260A1 unterstützen, weiter untersucht werden. Es wurden Reaktionsbedingungen gewählt, die bzgl. der NADPH Konzentration sowie dem Verhältnis der Cytochrom P450 System Komponenten zueinander den Bedingungen im CYP260A1 abhängigen Nootkaton Umsatz entsprachen. Die apparenten  $k_{cat}$ -Werte (ausgedrückt als mol NADPH oxidiert pro Sekunde pro mol CYP260A1) und  $K_m$ -Werte ( $\mu\text{M}$ ) der vollständig rekonstituierten Systeme für Nootkaton wurden ermittelt, indem die Substratkonzentration variiert wurde, während die Konzentration der Proteine konstant blieb. Unter diesen Bedingungen konnten die kinetischen Parameter für die beiden bevorzugten Kombinationen FdRB-Fdx2-CYP260A1 und FdRB-Fdx8-CYP260A1 bestimmt werden (Abbildung 3.5.2.2). Das erstgenannte System zeichnet sich durch einen apparenten  $k_{cat}$ -Wert von  $0,70 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$  und einen  $K_m$ -Wert von  $0,12 \pm 0,07 \mu\text{M}$  aus. Die Kombination FdRB-Fdx8-CYP260A1 wies sowohl einen höheren  $k_{cat}$ -Wert von  $0,96 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$  als auch einen höheren  $K_m$ -Wert von  $0,54 \pm 0,16 \mu\text{M}$  auf.

Die rekonstituierten Systeme, die als Flavoproteinkomponente FdRA enthielten, wiesen beide unter den genannten Bedingungen keine ausreichend großen Unterschiede in ihrer NADPH Verbrauchsrate auf, um die Bestimmung der kinetischen Parameter zu erlauben.

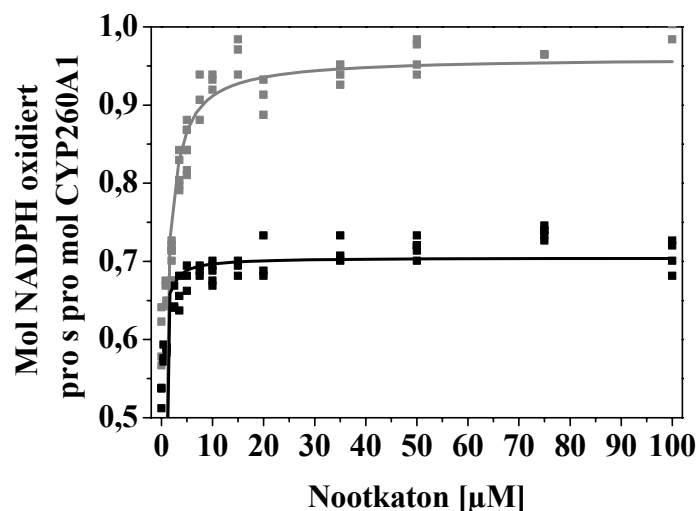


Abbildung 3.5.2.2: NADPH Oxidationsraten der Systeme FdRB-Fdx2-CYP260A1 (schwarz) und FdRB-Fdx8-CYP260A1 (grau)

Nach Zugabe von NADPH wurde die Absorptionsabnahme bei 340 nm für 5 min verfolgt. Aus der Steigung konnte mit  $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  der NADPH Verbrauch berechnet werden. Für jede Konzentration wurden mindestens 3 Messwerte verwendet.

#### 4. Diskussion und Ausblick

Myxobakterien, insbesondere diejenigen des Genus *Sorangium*, sind aufgrund ihres biotechnologischen Potentials als Produzenten pharmazeutisch relevanter Sekundärmetabolite in den letzten Jahren in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt (Wenzel und Müller, 2009a; Wenzel und Müller, 2009b). Auch wenn bislang nur eine Substanz myxobakteriellen Ursprungs, das Epothilon „Ixabepilone“, in den USA zur Krebstherapie zugelassen ist (Vahdat, 2008), werden verschiedene andere Sekundärmetabolite aus Myxobakterien zur Zeit in klinischen Studien getestet. Von besonderem Interesse ist die Tatsache, dass sich viele myxobakterielle Naturstoffe durch einen ungewöhnlichen Wirkungsmechanismus auszeichnen (Weissman und Müller, 2009). Die Identifikation neuer Sekundärmetabolite aus Myxobakterien bzw. ihrer Biosynthesewege stellt daher nicht nur für die Grundlagenforschung, sondern auch für die pharmazeutische Industrie und Biotechnologie eine zentrale Herausforderung dar. In diese Biosynthesewege eingebunden sind oft Cytochrome P450, die sich auch in anderen Organismen dadurch auszeichnen, dass sie eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Sekundärstoffen spielen (Guengerich, 2002; Bernhardt, 2006). Um ihre Funktion erfüllen zu können, ist die Mehrzahl der Cytochrome P450 jedoch auf die Aktivität von mindestens einem Elektronenmediatorprotein angewiesen, das die für die Reaktion benötigten Elektronen vom primären Elektronendonator auf das Cytochrom P450 überträgt (Hannemann *et al.*, 2007). Aufgrund ihrer Komplexität gibt es jedoch nur wenige bakterielle Cytochrom P450 Systeme, deren natürlicher Elektronentransportweg untersucht und vollständig aufgeklärt ist (Chun *et al.*, 2007). So ist beispielsweise bei keinem der sieben myxobakteriellen Naturstoffe, bei deren Biosynthese Cytochrome P450 involviert sind (Epothilon (Ogura *et al.*, 2004), Leupyrrin (Bode *et al.*, 2004), Spirangien (Frank *et al.*, 2007a), Myxovirescin (Simunovic *et al.*, 2006), Aurafuron (Frank *et al.*, 2007b), Ajudazol (Buntin *et al.*, 2008)) und Stigmatellin (Gaitatzis *et al.*, 2002)), bislang die Elektronentransportkette zum Cytochrom P450 beschrieben worden.

Die Verfügbarkeit von Sequenzdaten vollständiger Genome eröffnet jedoch die Möglichkeit, gezielt sowohl nach Cytochrom P450 Genen als auch nach den Genen möglicher Interaktionspartner zu suchen. Ziel dieser Arbeit war dementsprechend die Identifikation möglicher Elektronentransferketten zu Cytochromen P450 in *Sorangium cellulosum* So ce56 sowie die Charakterisierung der einzelnen Mediatorproteine. Im Folgenden sollen die

gewonnenen Erkenntnisse diskutiert und ein Ausblick auf mögliche biotechnologische Anwendungen gegeben werden.

#### 4.1. Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen aus *Sorangium cellulosum* So ce56

Das Genom von *Sorangium cellulosum* So ce56 (Schneiker *et al.*, 2007) ist eines von bislang vier vollständig sequenzierten myxobakteriellen Genomen (außerdem noch *Myxococcus xanthus* DK1622 (Goldman *et al.*, 2006), *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 (Ronning und Nierman, 2007) und *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C (Thomas *et al.*, 2008)). Mit einer Größe von 13 Mbp stellt es das größte bislang beschriebene prokaryotische Genom dar und verfügt über 9367 Gene (Schneiker *et al.*, 2007). Im So ce56 Genom sind 21 Cytochrome P450 (Khatri, 2009) sowie 8 potentielle Ferredoxine und 2 Ferredoxin Reduktasen kodiert. Gene für Cytochrom P450 Reduktasen oder Flavodoxine wurden hingegen nicht gefunden.

Von den acht identifizierten Ferredoxinen konnten sieben heterolog in *E. coli* überexprimiert werden. Lediglich für Fdx4 konnten keine Bedingungen gefunden werden, unter denen eine Expression in *E. coli* nachweisbar war. Fdx7 wurde zwar stark exprimiert, lag aber in Form von Einschlusskörpern vor und wurde daher von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Es fällt auf, dass sowohl Fdx4 als auch Fdx7 anhand ihrer Sequenz als potentielle Dicluster-Typ Ferredoxine eingeordnet wurden. Außerdem befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu beiden Genen jeweils ein Gen, dessen Genprodukt über eine Flavin-Bindedomäne verfügt und Ähnlichkeiten zur Flavoprotein Untereinheit (FrdA) der Fumarat Reduktase aufweist. Allerdings ist sowohl Fdx4 mit 11,9 kD als auch Fdx7 mit 10,4 kD deutlich kleiner als die Eisen-Schwefel-Cluster haltige Untereinheit (FrdB) der Fumarat Reduktase aus *E. coli* (27,1 kD) und beide könnten anhand ihrer Sequenz maximal zwei Eisen-Schwefel-Cluster binden. Dennoch erinnert die genomische Organisation stark an den Aufbau der Fumarat Reduktase aus *E. coli*, bei der das frdB Gen distal vom frdA Gen lokalisiert ist und mit diesem sogar partiell überlappt. Ähnlich aufgebaut in ihren Proteinkomponenten ist auch die Succinat Dehydrogenase, die mit der Fumarat Reduktase verwandt ist (Cole *et al.*, 1982).

Fdx6 konnte in löslicher Form exprimiert werden, war aber so instabil, dass es nicht vollständig gereinigt werden konnte. Das UV/Vis-Spektrum des teilweise gereinigten Proteins (nach IMAC) belegt, dass es sich, wie vorhergesagt, um ein Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxin handelt. Auch in der SDS-PAGE lief das Protein, wie aufgrund des theoretischen Molekulargewichtes von 25,7 kD erwartet, auf der Höhe der 25 kD Markerbande. Aufgrund der Instabilität des Proteins konnte eine weitergehende Charakterisierung jedoch nicht



durchgeführt werden. Da auch der genomische Kontext und die phylogenetische Analyse keine Hinweise auf eine mögliche Rolle des Fdx6 liefern, kann Fdx6 keine Funktion zugeordnet werden. Eine Beteiligung des Fdx6 an Cytochrom P450 Systemen erscheint aufgrund des für ein Ferredoxin relativ hohen theoretischen pIs sowie des hohen Molekulargewichts unwahrscheinlich.

Von den fünf gereinigten Ferredoxinen gehörten drei der Gruppe der [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine an, während es sich bei den beiden anderen um [3Fe-4S]-Cluster Ferredoxine handelte. Unter den myxobakteriellen [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen war Fdx1 das Protein, das die stärkste Ähnlichkeit zu den in Klasse I Cytochrom P450 Systemen vorkommenden [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen Adx und Pdx aufwies. Auf dieses Protein soll an anderer Stelle noch genauer eingegangen werden.

Fdx3 hingegen besitzt zwar einen [2Fe-2S]-Cluster, unterscheidet sich aber sowohl hinsichtlich seiner Sequenz als auch seiner biophysikalischen Eigenschaften von den Vertebraten-Typ Ferredoxinen. Der genomische Kontext von *fdx3* gibt keinen Hinweis auf eine mögliche Funktion des Genproduktes, jedoch sprechen sowohl die phylogenetische Analyse als auch die spektralen Eigenschaften für eine Klassifizierung als Thioredoxin-artiges Ferredoxin. Sowohl in der UV/Vis-Spektroskopie als in der ESR-Spektroskopie zeigten sich Übereinstimmungen mit den [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen aus *C. pasteurianum* (Fujinaga und Meyer, 1993) und *Azotobacter vinelandii* (Chatelet und Meyer, 1999), die beide vermutlich in die Stickstofffixierung involviert sind. Bei Myxobakterien konnte die Fähigkeit zur Stickstofffixierung bislang nicht nachgewiesen werden, aber Homologe des Fdx3 treten auch in den anderen vollständig sequenzierten myxobakteriellen Genomen auf (Abbildung 4.1.1). Die Sequenz des Fdx3 scheint also innerhalb der Myxobakterien verbreitet zu sein, auch wenn sich zur Zeit nicht vorhersagen lässt, worin genau die Aufgabe dieses Proteins besteht.

Fdx5 ist ein myxobakterielles [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxin, das bezüglich seiner Eigenschaften in der UV/Vis- und CD-Spektroskopie den klassischen [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxinen ähnelt. Eine Untersuchung des Proteins mit ESR-Spektroskopie ergab eine rhombische Symmetrie des Clusters in Fdx5, die dem Aufbau der Pflanzen-Typ Ferredoxine entspricht. Der experimentell ermittelte isoelektrische Punkt von 6,48 ist allerdings untypisch, da Pflanzen-Typ Ferredoxine normalerweise einen sehr sauren pI zwischen pH 3 und 4 aufweisen (Sticht und Rosch, 1998). Da bekannt ist, dass auch Pflanzen-Typ Ferredoxine wie beispielsweise Spinat Fdx *in vitro* in der Lage sind, Elektronen an Cytochrom P450 Enzyme

zu liefern (Hannemann *et al.*, 2007), konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Fdx5 Teil eines myxobakteriellen Cytochrom P450 Systems ist.

Sorangium	1	-M <b>P</b> Q <b>R</b> K <b>R</b> Y <b>L</b> F <b>V</b> C <b>V</b> N <b>R</b> R <b>P</b> D <b>G</b> V <b>P</b> K <b>G</b> S <b>C</b> A <b>O</b> R <b>G</b> A <b>E</b> G <b>T</b> H <b>V</b> Q <b>L</b> K <b>A</b> A <b>L</b> A <b>E</b> R <b>G</b> L <b>A</b> K <b>V</b> E <b>A</b> R <b>A</b> C <b>S</b> A <b>S</b> C <b>L</b> D
Stigmatella	1	M <b>A</b> P <b>P</b> F <b>Q</b> R <b>H</b> V <b>F</b> V <b>C</b> T <b>N</b> R <b>R</b> P <b>D</b> G <b>H</b> P <b>K</b> G <b>C</b> C <b>A</b> T <b>K</b> G <b>A</b> E <b>E</b> V <b>R</b> A <b>A</b> F <b>K</b> S <b>E</b> M <b>E</b> K <b>R</b> - <b>G</b> L <b>K</b> G <b>Q</b> M <b>R</b> A <b>N</b> A <b>A</b> G <b>C</b> L <b>D</b>
Myxococcus	1	M <b>A</b> P <b>P</b> F <b>Q</b> R <b>H</b> V <b>F</b> V <b>C</b> T <b>N</b> R <b>R</b> P <b>D</b> G <b>N</b> P <b>K</b> G <b>C</b> C <b>A</b> S <b>K</b> G <b>A</b> E <b>E</b> V <b>R</b> A <b>A</b> F <b>K</b> A <b>E</b> L <b>D</b> K <b>R</b> - <b>G</b> L <b>K</b> G <b>Q</b> M <b>R</b> A <b>N</b> A <b>A</b> G <b>C</b> L <b>D</b>
Anaeromyxobacter	1	--M <b>R</b> E <b>R</b> H <b>E</b> V <b>F</b> V <b>C</b> E <b>N</b> H <b>R</b> D <b>P</b> S <b>D</b> P <b>R</b> G <b>A</b> C <b>C</b> N <b>K</b> G <b>S</b> E <b>A</b> I <b>R</b> A <b>L</b> K <b>A</b> E <b>V</b> A <b>R</b> R- <b>G</b> L <b>K</b> A <b>Q</b> V <b>R</b> V <b>N</b> G <b>A</b> G <b>C</b> L <b>D</b>
Sorangium	60	V <b>C</b> W <b>A</b> G <b>P</b> V <b>I</b> A <b>V</b> E <b>P</b> D <b>G</b> <b>Y</b> F <b>Y</b> G <b>R</b> V <b>T</b> P <b>A</b> D <b>V</b> E <b>I</b> V <b>D</b> A <b>L</b> A <b>S</b> - <b>G</b> R <b>R</b> V <b>E</b> R <b>L</b> V <b>L</b> P <b>P</b> E <b>D</b> F <b>T</b> E <b>A</b> T <b>A</b> A <b>P</b> P <b>L</b> P <b>A</b>
Stigmatella	60	T <b>C</b> A <b>M</b> C <b>V</b> S <b>V</b> V <b>I</b> <b>T</b> <b>P</b> E <b>G</b> L <b>W</b> <b>Y</b> G <b>G</b> V <b>K</b> T <b>E</b> D <b>V</b> T <b>I</b> V <b>D</b> E <b>H</b> L <b>L</b> G <b>G</b> K <b>P</b> V <b>E</b> R <b>L</b> M <b>M</b> P <b>F</b> M <b>K</b> K <b>G</b> P <b>K</b> P <b>E</b> P <b>G</b> K---
Myxococcus	60	T <b>C</b> S <b>F</b> G <b>V</b> A <b>V</b> V <b>V</b> <b>T</b> <b>P</b> E <b>G</b> T <b>W</b> <b>Y</b> G <b>G</b> V <b>K</b> V <b>E</b> D <b>V</b> K <b>D</b> I <b>V</b> E <b>Q</b> H <b>L</b> M <b>E</b> G <b>R</b> P <b>V</b> E <b>R</b> L <b>L</b> M <b>P</b> F <b>S</b> R <b>K</b> T <b>V</b> T <b>S</b> G-----
Anaeromyxobacter	58	A <b>C</b> A <b>F</b> G <b>P</b> S <b>I</b> V <b>V</b> <b>T</b> <b>P</b> E <b>G</b> V <b>W</b> <b>Y</b> G <b>H</b> V <b>S</b> P <b>A</b> D <b>V</b> E <b>I</b> V <b>E</b> R <b>H</b> L <b>V</b> G <b>T</b> P <b>V</b> E <b>R</b> L <b>R</b> L <b>P</b> R <b>L</b> E <b>G</b> R <b>E</b> P <b>P</b> V <b>S</b> -----
Sorangium	119	P <b>P</b> R <b>G</b> A <b>P</b> P <b>Q</b> A
Stigmatella		-----
Myxococcus		-----
Anaeromyxobacter		-----

**Abbildung 4.1.1: Alignment des *S. cellulosum* So ce56 Fdx3 mit den Homologe aus *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1, *Myxococcus xanthus* DK1622 und *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C**

Die homologen Proteine wurden durch eine Blast-Suche mit der Fdx3 Sequenz identifiziert. Es handelt sich um die Produkte der Gene EAU62693.1 (*Stigmatella*), MXAN 2926 (*Myxococcus*) und Adeh 1216 (*Anaeromyxobacter*). Das gezeigte Alignment wurde mit den Programmen „ClustalW“ und „Boxshade“ generiert. Identische Aminosäurereste sind schwarz unterlegt, konservierte Reste grau.

Den beiden [3Fe-4S]-Cluster Ferredoxinen Fdx2 und Fdx8 konnte weder anhand ihres genomischen Kontextes noch ihrer spektralen Eigenschaften eine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Im Gegensatz zu Fdx3 und Fdx5 wiesen beide jedoch ähnlich wie Fdx1 einen relativ sauren pI auf, was für eine mögliche Interaktion mit Cytochromen P450 förderlich sein könnte, da bekannt ist, dass bei diesen Interaktionen die Ladung der Proteine von Bedeutung ist (Müller *et al.*, 1999; Usanov *et al.*, 2002). Darüber hinaus deutete die phylogenetische Analyse (vergleiche Abbildung 3.1.1.1) auf eine Verwandtschaft des Fdx8 zu drei *Streptomyces* Ferredoxinen (Trower *et al.*, 1990b; Lei *et al.*, 2004; Chun *et al.*, 2007) hin, die zumindest in der Lage sind, ein Cytochrom P450 zu binden.

Da zum Aufbau einer funktionellen Elektronentransferkette neben den Ferredoxinen auch Ferredoxin Reduktasen benötigt werden, wurde das Genom von *Sorangium cellulosum* So ce56 nach geeigneten Kandidatengen durchsucht. Die Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB wurden beide durch eine „Blast“ Suche identifiziert. Die besten Ergebnisse wurden dabei mit der *E. coli* Ferredoxin-NADP Reduktase – auch Flavodoxin Reduktase genannt – (P28861) und der Spinat Ferredoxin-NADP Reduktase (P004559) erzielt. Weder das *fdrA* Gen noch das *fdrB* Gen scheint Teil eines Operons zu sein; auch liegt keines der beiden Gene in der Nähe zu einem der Ferredoxin oder Cytochrom P450 Gene. Diese räumliche Trennung der Ferredoxin Reduktase Gene von den Genen der Ferredoxine und/oder Cytochrom P450 Enzyme ist bei Sekundärmetabolitproduzenten (Parajuli *et al.*, 2004) verbreitet, erschwert jedoch die Identifikation der einzelnen Komponenten eines Cytochrom P450 Systems erheblich. Hinzu kommt die Tatsache, dass Ferredoxin Reduktasen oft nur relativ niedrige Expressionslevel aufweisen und unter Umständen dazu tendieren, ihren Flavinkofaktor zu verlieren (Ramachandra *et al.*, 1991; Jenkins und Waterman, 1994; Ewen *et al.*, 2008). Daher sind Ferredoxin Reduktasen oft die am meisten vernachlässigte Komponente der Cytochrom P450 Systeme. Da sie durch ihre Verwandtschaft zu den Ferredoxin Reduktasen aus *E. coli* und *Spinacia oleracea* identifiziert wurden, ist es folgerichtig, beide myxobakterielle Reduktasen der Flavoprotein Familie der Ferredoxin Reduktasen zuzuordnen, der auch die beiden Vergleichsproteine angehören (Karplus *et al.*, 1991; Ingelman *et al.*, 1997). Außerdem weisen FdRA und FdRB beide die Aminosäuresequenz RxYS(T) auf, die als eines der am stärksten konservierten Motive der Ferredoxin Reduktase Familie gilt (Dym und Eisenberg, 2001). Das Molekulargewicht der *Sorangium cellulosum* So ce56 Ferredoxin Reduktasen ähnelt mit 30,5 kD (FdRA) bzw. 26,7 kD (FdRB) ebenfalls den Werten, die von Mitgliedern der Ferredoxin Reduktase Familie wie den Ferredoxin Reduktasen aus *E. coli* (27,6 kD, (Bianchi *et al.*, 1993)), *A. vinelandii* (29 kD, (Sridhar Prasad *et al.*, 1998)) und Spinat (35,3 kD, (Karplus *et al.*, 1984)) bekannt sind. Die funktionell ähnlichen, jedoch mit der Ferredoxin Reduktase Familie nicht verwandten Mitglieder der Glutathion Reduktase Familie wie AdR oder die zur AdR homologen Proteine aus der Spalthefe oder aus *Mycobacterium tuberculosis* hingegen sind mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kD deutlich größer (Sagara *et al.*, 1993; McLean *et al.*, 2003; Ewen *et al.*, 2008). Trotz der Unterschiede im Molekulargewicht gleichen die beiden myxobakteriellen Reduktasen aber hinsichtlich ihres experimentell ermittelten isoelektrischen Punktes (FdRA ca. pH 6,3-6,4; FdRB pH 7,1) eher der AdR (ca. pH 7 (Ziegler *et al.*, 1999)) als der Ferredoxin Reduktase aus *E. coli* (pH 4,8; (McIver *et al.*, 1998)).

FdRA und FdRB zeigen beide in ihrer Sequenz die typische Ferredoxin Reduktase Domänenstruktur (Carrillo und Ceccarelli, 2003) mit je einer Domäne für die Bindung von NADPH und FAD. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass beide Proteine als Monomere vorliegen, die ein nicht-kovalent gebundenes FAD pro Proteinmolekül als prosthetische Gruppe enthalten. Dieser Aufbau ist den Ferredoxin Reduktasen der Ferredoxin Reduktase Familie (z.B. aus *E. coli* (McIver *et al.*, 1998)) wie auch der Glutathion Reduktase Familie (z.B. AdR (Foster und Wilson, 1975)) gemein (Carrillo und Ceccarelli, 2003). Das FAD als prosthetische Gruppe verleiht den Flavoproteinen im oxidierten Zustand ihre typische gelbe Farbe und ist für die charakteristischen Absorptionsmaxima bei ca. 360 nm und 450 nm verantwortlich (Macheroux, 1999). Durch die jeweilige Umgebung des FAD im Protein kann es zu leichten Verschiebungen dieser Maxima kommen; außerdem weisen die Proteinspektren normalerweise noch eine Schulter hinter dem zweiten Maximum auf. Bei der FdRA liegen die durch den Chromophor hervorgerufenen Maxima bei 369 nm und 448 nm; zudem ist eine Schulter bei 473 nm zu beobachten. Ähnliche Werte sind von Cytochrom P450 assoziierten Ferredoxin Reduktasen wie der mitochondrialen AdR (Maxima bei 376 und 450 nm, Schulter bei 475 nm (Sagara *et al.*, 1993)) oder der bakteriellen PdR (Maxima bei 379 und 455 nm, Schulter bei 480 nm (Sevrioukova und Poulos, 2002)) bekannt. Die myxobakterielle FdRB hingegen weist im Vergleich dazu eine Verschiebung der Maxima zu längeren Wellenlängen hin (Maxima bei 388 nm und 457 nm, Schulter bei 490 nm) auf wie sie auch bei der Ferredoxin Reduktase aus *E. coli* auftritt (Maxima bei 400 nm und 456 nm, Schulter bei 483 nm (McIver *et al.*, 1998)). Die molaren Extinktionskoeffizienten bei den flavintypischen Maxima bei ca. 450 nm sind für FdRA ( $8760 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) und FdRB ( $8730 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) sehr ähnlich und stimmen in der Größenordnung auch mit dem für die *E. coli* Ferredoxin Reduktase veröffentlichten Wert ( $7100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (McIver *et al.*, 1998)) sehr gut überein.

Die meisten Ferredoxin Reduktasen sind spezifisch für NADPH (Carrillo und Ceccarelli, 2003) (z.B. Spinat Ferredoxin Reduktase (Nakamura und Kimura, 1971), *E. coli* Flavodoxin Reduktase (Leadbeater *et al.*, 2000) oder AdR (Lambeth und Kamin, 1976)), einige aber auch für NADH (z.B. PdR (Roome *et al.*, 1983) oder *Methylosinus trichosporium* FdR (Chen und Yoch, 1989)). Es gibt allerdings auch Fälle, wie bei der Arh1 aus *S. cerevisiae*, in denen die Ferredoxin Reduktase sowohl NADH als auch NADPH mit annähernd gleicher Effizienz verwenden kann (Lacour *et al.*, 1998). Die myxobakteriellen Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB konnten sowohl mit NADH als auch mit NADPH reagieren, zeigten aber beide eine deutliche Präferenz für NADPH. Der apparente  $K_m$  Wert für NADPH beträgt bei FdRA  $474 \mu\text{M}$  und bei FdRB  $120 \mu\text{M}$ . Im Vergleich zu vielen anderen Ferredoxin Reduktasen ( $K_m$

NADPH z.B. 2,2  $\mu\text{M}$  bei Spinat Ferredoxin Reduktase (Nakamura und Kimura, 1971), 1,82  $\mu\text{M}$  bei boviner AdR (Lambeth und Kamin, 1976), 3,9  $\mu\text{M}$  bei *E. coli* Flavodoxin Reduktase (Leadbeater *et al.*, 2000), 4,1  $\mu\text{M}$  bei *Mycobacterium tuberculosis* FprA (McLean *et al.*, 2003) und 11,3  $\mu\text{M}$  bei *Arabidopsis thaliana* mitochondrialer FdR (Takubo *et al.*, 2003)) erscheinen diese Werte relativ hoch, allerdings wurden auch bereits ähnlich hohe  $K_m$  Werte für den primären Elektronendonator beobachtet ( $K_m$  NADH 125  $\mu\text{M}$  bei *Methylophilus trichosporium* FdR (Chen und Yoch, 1989)).

Reduziert man FdRA und FdRB so zeigen sich eindeutige Unterschiede zwischen den Proteinen. Zwar läuft eine Reduktion mit Dithionit bei beiden Proteinen nur relativ langsam und ohne Bildung eines Semichinons ab, jedoch ist sie nur bei FdRB vollständig reversibel, während FdRA im reduzierten Zustand bzw. bei Reoxidation durch Luftsauerstoff sein FAD zu verlieren scheint. Eine Destabilisierung im reduzierten Zustand wurde auch bei der *E. coli* Flavodoxin Reduktase beschrieben (Jarrett und Wan, 2002); bei diesem Protein kam es zu partieller Entfaltung und Dissoziation des  $\text{FADH}_2$ . Gleichzeitig wurde eine Verminderung der Halbumwandlungstemperatur der *E. coli* Flavodoxin Reduktase von 66°C im oxidierten Zustand – einem Wert, der sehr gut mit der für FdRB gemessenen Halbumwandlungstemperatur von 67,1°C übereinstimmt – auf 41°C im reduzierten Zustand beobachtet.

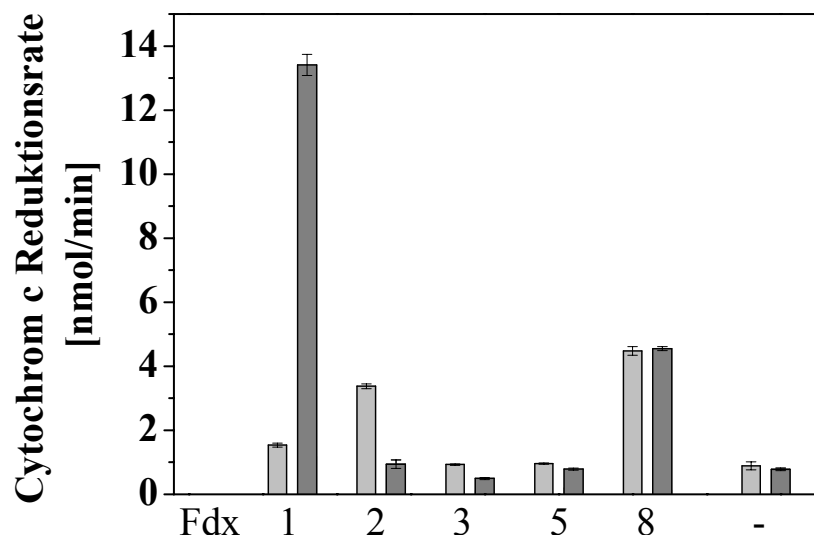
Wird NAD(P)H als Reduktionsmittel verwendet, so ist in der ESR-Spektroskopie bei FdRA wie auch bei FdRB die Bildung eines blauen Semichinons zu beobachten. Die Bildung neutraler Semichinonradikale wurde auch bei verschiedenen anderen Ferredoxin Reduktasen wie Spinat Ferredoxin Reduktase (Huang *et al.*, 1969), *E. coli* Ferredoxin Reduktase (McIver *et al.*, 1998) und AdR (Kitagawa *et al.*, 1982) nachgewiesen. Das FdRB Semichinon ist auch in der UV/Vis-Spektroskopie gut sichtbar, während bei der FdRA das Semichinonsignal bei dieser Methode durch das Signal des stark ausgebildeten CT-1 Komplexes ( $\text{FdRA}_{\text{ox}}\text{-NADPH}$ ) überlagert ist. Ebenfalls erkennbar ist im Fall der FdRA ein Maximum bei ca. 800 nm, das auf einen CT-2 Komplex ( $\text{FdRA}_{\text{red}}\text{-NADP}^+$ ) zurückzuführen ist. Die Bildung von CT Komplexen ist ebenfalls von Ferredoxin Reduktasen wie der AdR (Lambeth und Kamin, 1976) oder der Ferredoxin Reduktase aus *Anabaena* (Tejero *et al.*, 2007) bekannt. Daher kann das unterschiedliche Verhalten der beiden myxobakteriellen Ferredoxin Reduktasen bei der Reduktion nicht als Indiz für eine mögliche Rolle in CytochromP450 Systemen gewertet werden.

## 4.2. Interaktion der Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen

Da weder durch den genomischen Kontext, die phylogenetische Analyse oder die biophysikalische Charakterisierung der Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen aus *Sorangium cellulosum* So ce56 bestimmt werden konnte, welche der Proteine als Komponenten von Cytochrom P450 Systemen in Frage kommen, sollte die Fähigkeit der Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen getestet werden, miteinander in Wechselwirkung zu treten.

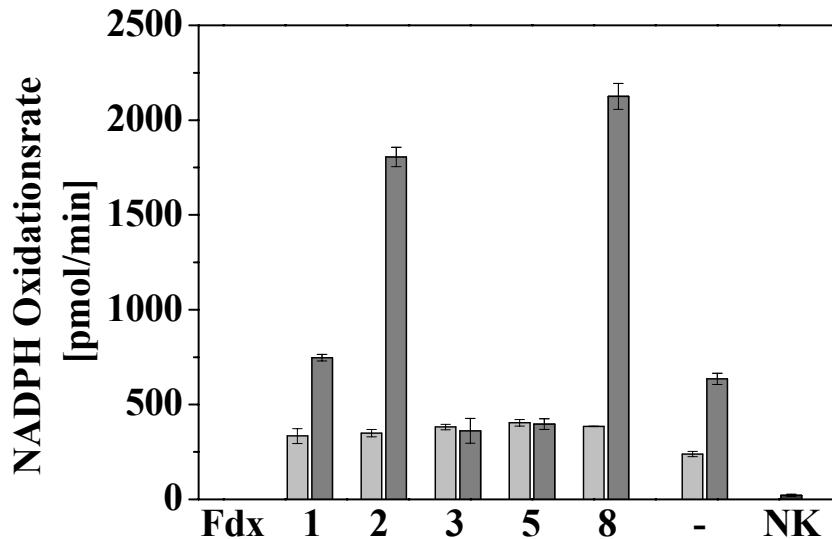
Hierzu wurde zunächst der Cytochrom *c* Reduktionsassay verwendet. Dieser Test ist eine bei der Untersuchung von Klasse I Cytochrom P450 Systemen etablierte Methode, um die Fähigkeit eines Ferredoxins zur Interaktion mit einer Ferredoxin Reduktase zu ermitteln (Schiffler *et al.*, 2004a). Der Test beruht auf der Reduktion von Cytochrom *c*, das die dafür benötigten Elektronen über eine aus einer Ferredoxin Reduktase und einem Ferredoxin bestehenden Elektronentransferkette von NAD(P)H erhält. Die Reduktion des Cytochrom *c* kann photometrisch anhand der Absorptionsänderung bei 550 nm verfolgt werden. Da die mit den Kombinationen der myxobakteriellen Proteine erhaltenen Cytochrom *c* Reduktionsraten [nmol Cytochrom *c* reduziert pro min] unter den üblichen Konzentrationsbedingungen (0,05  $\mu$ M FdR, 2  $\mu$ M Fdx und 100  $\mu$ M Cytochrom *c* (Schiffler *et al.*, 2004a)) im Vergleich zu den parallel getesteten Kontrollkombinationen Adx-AdR ( $10,8 \pm 0,2$ ) und Spinat Fdx-FdR ( $3,8 \pm 0,1$ ) sehr niedrig und daher stark fehlerbelastet waren (Fdx1-FdRB:  $1,19 \pm 0,02$ , alle anderen Mittelwerte  $< 0,2$  und mit Standardabweichung im Bereich der Negativkontrollen) wurde für die Kombinationen der myxobakteriellen Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen die Proteinkonzentration auf 1  $\mu$ M FdR und 10  $\mu$ M Fdx erhöht. Unter diesen optimierten Bedingungen ergab sich folgendes Bild (Abbildung 4.2.1): das deutlich beste Ergebnis wurde auch hier mit der Kombination Fdx1-FdRB erzielt, aber auch die Kombinationen Fdx2-FdRA, Fdx8-FdRA und Fdx8-FdRB zeigten eine deutlich höhere Cytochrom *c* Oxidationsrate als die jeweilige Kontrolle ohne Ferredoxin. Überraschenderweise zeigt die Kombination Fdx3-FdRB eine im Vergleich zur Kontrolle verminderte Reduktion des Cytochrom *c*; dies könnte darauf hindeuten, dass Fdx3 entweder die Reduktion der FdRB behindert, oder aber dass Fdx3 Elektronen von FdRB aufnimmt, diese aber nicht auf Cytochrom *c* übertragen kann. Da nicht vorausgesetzt werden kann, dass alle Ferredoxine mit Cytochrom *c* interagieren können, wurden zusätzlich Tests durchgeführt, bei denen die Oxidation von NADPH als Maß für die Effizienz der Elektronenübertragung von einer Ferredoxin Reduktase auf ein Ferredoxin

verwendet wurde. Hierbei zeigte sich (Abbildung 4.2.2), dass die Kombinationen der FdRB mit Fdx2 bzw. Fdx8 sehr viel höhere NADPH Oxidationsraten aufwiesen als Fdx1-FdRB. Dies könnte damit erklärt werden, dass die beiden [3Fe-4S]-Cluster Ferredoxine nur schlecht Elektronen auf Cytochrom *c* übertragen können. Es ist aber auch denkbar, dass bei diesen Kombinationen eine Entkopplung auftritt und ROS (reactive oxygen species) gebildet werden. Die unterschiedlichen Ferredoxin Kombinationen mit FdRA weisen alle recht ähnliche NADPH Oxidationsraten auf, die etwas höher als die Kontrolle ohne Ferredoxin sind. Die Kombination Fdx3-FdRB weist ebenso wie beim Cytochrom *c* Test eine niedrigere Aktivität auf. Diese Beobachtung spricht für die Erklärung, dass Fdx3 die Reduktion von FdRB inhibiert. Interessanterweise konnte im NADPH Oxidationsassay ein ähnliches Verhalten bei der Kombination Fdx5-FdRB beobachtet werden.



**Abbildung 4.2.1: Aktivität verschiedener Kombinationen von Ferredoxinen und Ferredoxin Reduktasen aus *Sorangium cellulosum* So ce56 im Cytochrom *c* Reduktionsassay**

Die Reduktion von Cytochrom *c* in Abhängigkeit verschiedener Fdx-FdR Kombinationen wurde über einen Zeitraum von 60 s bei einer Wellenlänge von 550 nm ( $\epsilon_{550} = 20,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Schiffler *et al.*, 2004a)) verfolgt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 1  $\mu\text{M}$  FdR, 10  $\mu\text{M}$  Fdx und 100  $\mu\text{M}$  Cytochrom *c* in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NADPH zu einer Endkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  gestartet. In hellgrau sind die Kombinationen mit FdRA dargestellt, in dunkelgrau die Kombinationen mit FdRB. Außerdem wurden Ansätze ohne Ferredoxin, nur mit der jeweiligen Reduktase getestet. Für jede Kombination wurden mindestens Triplikatmessungen durchgeführt.



**Abbildung 4.2.2: Aktivität verschiedener Kombinationen von Ferredoxinen und Ferredoxin Reduktasen aus *Sorangium cellulosum* So ce56 im NADPH Oxidationsassay**  
 Die Oxidation von NADPH in Abhängigkeit verschiedener Fdx-FdR Kombinationen wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) gemessen. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 2  $\mu\text{M}$  FdR, 20  $\mu\text{M}$  Fdx und 200  $\mu\text{M}$  NADPH in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, in einem Volumen von 500  $\mu\text{l}$ . Die Reaktion wurde durch Zugabe von NADPH gestartet und über einen Zeitraum von 5 min verfolgt. In hellgrau sind die Kombinationen mit FdRA dargestellt, in dunkelgrau die Kombinationen mit FdRB. Als Kontrolle dienten Ansätze, die nur die jeweilige Ferredoxin Reduktase enthielten (-) bzw. nur NADPH im Reaktionspuffer (NK, schwarz). Für jede Kombination wurden mindestens Triplikatmessungen durchgeführt.

Fasst man die Ergebnisse aus dem Cytochrom *c* Reduktionsassay und dem NADPH Oxidationsassay zusammen, so lässt sich sagen, dass die effizientesten Elektronentransferketten und damit die erfolgversprechendsten Kandidaten für eine Funktion in Cytochrom P450 Systemen die Kombinationen Fdx1-FdRB, Fdx2-FdRB und Fdx8-FdRB sind. Allerdings geben beide Testsysteme nur Auskunft über den Elektronenfluss von der Ferredoxin Reduktase zum Ferredoxin und erlauben keinen Rückschluss darauf, ob ein bestimmtes Fdx mit einem bestimmten CYP interagieren kann. Daher wurden *in vitro* Rekonstitutionsassays mit zwei verschiedenen Cytochrom P450 Enzymen durchgeführt. Es zeigte sich, dass tatsächlich die drei Kandidatenkombinationen Fdx1-FdRB, Fdx2-FdRB und Fdx8-FdRB als Elektronentransferkette zu Cytochrom P450 Enzymen dienen können, obwohl auch andere Kombinationen (Fdx2-FdRA und Fdx8-FdRA) in geringerem Umfang dazu in der Lage sind. Die als Elektronenmediatorproteine in Cytochrom P450 Systemen aktiven Ferredoxine Fdx1, Fdx2 und Fdx8 sowie die Ferredoxin Reduktase FdRB sollen im Folgenden im Detail betrachtet werden.



### 4.3. FdRB

Wie bereits beschrieben gehört die FdRB der Ferredoxin Reduktase Familie an, zu der auch die Chloroplasten Ferredoxin Reduktasen und einige Ferredoxin Reduktasen bakteriellen Ursprungs gezählt werden (Sridhar Prasad *et al.*, 1998; Dym und Eisenberg, 2001; Karplus und Faber, 2004). Obwohl keine strukturelle Verwandtschaft mit den Cytochrom P450 System assoziierten Ferredoxin Reduktasen der Glutathion Reduktase Familie – wie beispielsweise der AdR (Hanukoglu und Gutfinger, 1989; Ziegler *et al.*, 1999) – besteht, ist eine durch konvergente Evolution entstandene funktionelle Verwandtschaft nachgewiesen (Ziegler *et al.*, 1999; Carrillo und Ceccarelli, 2003; Aliverti *et al.*, 2008). Daher können Ferredoxin Reduktasen wie beispielsweise die Reduktasen aus Spinat (Nakamura und Kimura, 1971) oder *E. coli* (McIver *et al.*, 1998) in Kombination mit Ferredoxin bzw. Flavodoxin oftmals funktionelle Elektronentransferketten zu verschiedenen Cytochromen P450 bilden, obwohl sie eigentlich keine Komponenten von Cytochrom P450 Systemen sind (Jenkins und Waterman, 1994; Jenkins und Waterman, 1998; Faro *et al.*, 2003; Chun *et al.*, 2006; Gonip *et al.*, 2009). Ferredoxin Reduktasen beider Familien können teilweise auch in Kombination mit Ferredoxinen (oder bei der *E. coli* Flavodoxin Reduktase auch Flavodoxinen) aus anderen Spezies eingesetzt werden (siehe die Übersichtsarbeit von Hannemann, 2007 (Hannemann *et al.*, 2007)). Diese bei Ferredoxin Reduktasen offenbar verbreitete Fähigkeit, mit unterschiedlichen Ferredoxinen in Wechselwirkung treten zu können, wurde auch bei der myxobakteriellen FdRB beobachtet, die in der Lage ist, alle drei myxobakteriellen Ferredoxine, für die eine Interaktion mit einem Cytochrom P450 Enzym nachgewiesen werden konnte, zu reduzieren. Dies ist besonders bemerkenswert, da es sich einmal um ein [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxin (Fdx1) handelt, während die anderen beiden Ferredoxine (Fdx2 und Fdx8) jeweils einen [3Fe-4S]-Cluster gebunden haben. Darüber hinaus zeigte sich, dass FdRB auch die mitochondrialen [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine Adx und Etp1<sup>fd</sup> reduzieren kann (siehe Abschnitt 3.5.). Ein ähnliches Beispiel für die Kompatibilität von Klasse I Ferredoxinen und Ferredoxin Reduktasen unterschiedlichen Ursprungs ist auch aus einem Actinobakterium bekannt: die zu dem bakteriellen Cytochrom P450 System gehörende, NADH-abhängige Ferredoxin Reduktase FdRmor kann sowohl mit dem autologen [3Fe-4S]-Cluster Ferredoxin Fdmor wie auch mit Adx interagieren, nicht jedoch mit Spinat Ferredoxin.

Um die Frage zu beantworten, wie genau die Interaktion der FdRB mit den unterschiedlichen Ferredoxinen erfolgt, sind sicherlich weiterreichende Strukturstudien erforderlich. Jedoch kann vermutet werden, dass wie bei anderen Ferredoxin Reduktasen auch ionische Wechselwirkungen eine Rolle spielen, bei denen basische Reste der Ferredoxin Reduktase und saure Reste des Ferredoxins miteinander wechselwirken (Aliverti *et al.*, 2008). Dafür spricht auch, dass die drei myxobakteriellen Ferredoxine Fdx1, Fdx2 und Fdx8 (pI 4,1 – 4,6) sowie das Adx (4,0 (Maruya *et al.*, 1983)) ähnliche isoelektrische Punkte aufweisen. Auch ähnelt der experimentell für FdRB ermittelte pI (ca. 7) dem der AdR (ca. 7 (Ziegler *et al.*, 1999)). Interessanterweise liegt der experimentell bestimmte pI der FdRB damit um fast 1 pH Einheit unter dem theoretischen pI; Ähnliches wurde auch bei der Ferredoxin Reduktase aus *E. coli* berichtet, bei der jedoch sowohl der experimentell ermittelte pI (4,8) als auch der theoretischen pI (6,2) (McIver *et al.*, 1998) deutlich saurer als bei der FdRB ist.

#### 4.4. Fdx1

Fdx1 kann von der myxobakteriellen FdRB Elektronen aufnehmen und diese auch am effizientesten von allen getesteten myxobakteriellen Ferredoxinen auf Cytochrom *c* übertragen. Mit FdRA hingegen zeigte Fdx1 nur eine schwache Aktivität sowohl im NADPH Oxidationsassay als auch im Cytochrom *c* Test, so dass davon ausgegangen werden kann, dass FdRB der Hauptelektronenlieferant für Fdx1 ist. Obwohl besonders das Ergebnis des Cytochrom *c* Assays vielversprechend aussah und Fdx1 auch bezüglich seiner biophysikalischen Eigenschaften von allen hier untersuchten Ferredoxinen am ähnlichsten zu den klassischen CYP Klasse I assoziierten Ferredoxinen Adx und Pdx ist, zeigte sich, dass Fdx1 als Elektronenmediator zu dem autologen CYP260A1 nicht geeignet ist. Allerdings ist Fdx1 als einziges myxobakterielles Ferredoxin in der Lage, Elektronen auf das heterologe mitochondriale CYP11A1 zu übertragen. Interessanterweise handelt es sich bei Fdx1 ebenso wie bei Adx, dem physiologischen Redoxpartner des CYP11A1, um ein Ferredoxin mit einem axialen [2Fe-2S]-Cluster. Die Charakterisierung des Fdx1 zeigte deutliche Ähnlichkeiten zu Adx hinsichtlich der spektralen Eigenschaften (UV/Vis, CD, ESR) sowie der thermischen Stabilität. Allerdings ist Fdx1 mit einer Länge von 118 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 12,8 kD etwas kleiner als das mature Adx, das aus 128 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 14,4 kD aufweist. Auch der isoelektrische Punkt des Fdx1 ist mit 4,6 (theoret. 4,9) etwas weniger sauer als der des bovinen Adx (4,0, (Maruya *et al.*, 1983)). Dieser Unterschied könnte dazu beitragen, dass Fdx1 nicht in der Lage ist, effizient mit der AdR oder dem AdR-Homolog der Spaltheife, Arh1, zusammenzuarbeiten, da bekannt ist, dass elektrostatische Aspekte eine Rolle bei der Wechselwirkung von Ferredoxinen mit ihren Interaktionspartnern spielen (Jenkins und Waterman, 1994; Sagara *et al.*, 1999; Schiffler *et al.*, 2004b).

Um weitere Ähnlichkeiten oder Unterschiede zu Adx aufzudecken, wurde das Redoxpotential von Fdx1 spektroskopisch mithilfe des Farbstoffes SafraninT (Uhlmann *et al.*, 1997) bestimmt. Das Redoxpotential von Fdx1 lag mit  $-362 \pm 23$  mV ( $n = 7$ ) um etwa 90 mV unter dem des Adx (-273 mV; (Grinberg *et al.*, 2000)) und damit schon beinahe in dem für Pflanzen-Typ Ferredoxine typischen Bereich von -390 mV bis -425 mV (Cammack *et al.*, 1977). Ein ähnlich niedriges Redoxpotential weist mit -353 mV auch das zum bovinen Adx homologe und ebenfalls in den Mitochondrien lokalisierte [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxin aus *Schizosaccharomyces pombe* – Etp1<sup>fd</sup> (electron transport protein 1 ferredoxin domain) – auf

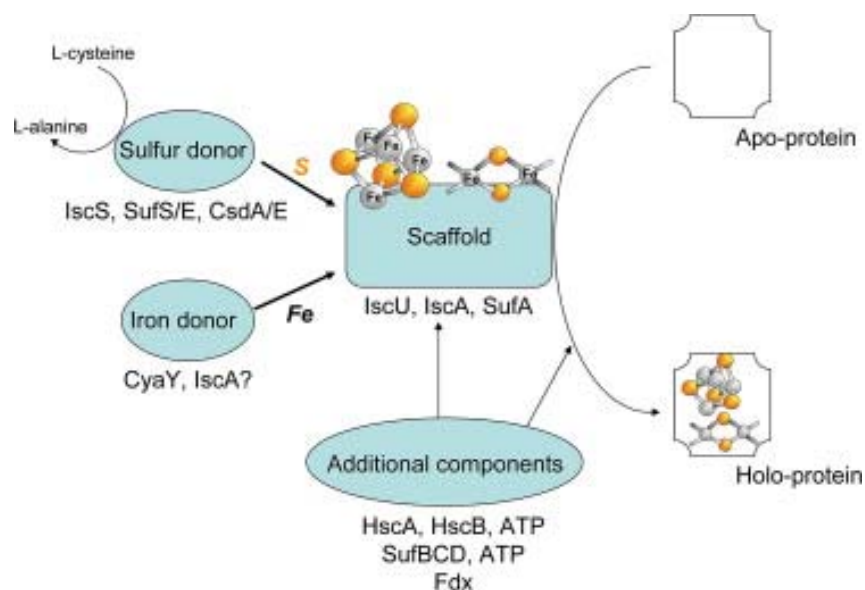
(Schiffler *et al.*, 2004a). Das heterolog in *E. coli* exprimierte Etp1<sup>fd</sup> ist mit einer Länge von 127 Aminosäuren nur um einen Rest kürzer als das mature bovine Adx und ähnelt diesem entsprechend auch hinsichtlich seines Molekulargewichts von 14,1 kD mehr als Fdx1. Auch die durch spektroskopische Untersuchungen (UV/Vis, CD, ESR) erhaltenen Daten weisen auf verwandte Proteinstrukturen von Adx und Etp1<sup>fd</sup> hin (Schiffler *et al.*, 2004a). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Etp1<sup>fd</sup> Adx sowohl *in vivo* in der Spalthefe (Bureik *et al.*, 2002) als auch *in vitro* in Rekonstitutionsassays funktionell ersetzen und Elektronen auf Säuger-Cytochrome P450 (u.a. CYP11A1) übertragen kann (Schiffler *et al.*, 2004a). Darüber hinaus ist rekombinantes Etp1<sup>fd</sup> *in vitro* auch in der Lage, Elektronen von der bovinen AdR auf das bakterielle CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* zu übertragen. Damit ist es das erste bekannte Ferredoxin aus einem einzelligen Organismus, das sowohl bakterielle als auch mitochondriale Klasse I Cytochrome P450 vollständig reduzieren kann (Bureik *et al.*, 2002). Dies ist umso überraschender, da davon ausgegangen werden kann, dass die physiologische Funktion des Etp1<sup>fd</sup> in der Hefe nicht in der Reduktion von Cytochrom P450 Enzymen besteht, da *S. pombe* über keine mitochondrialen Cytochrome P450 verfügt (Bureik *et al.*, 2002). Vielmehr wird vermutet, dass Etp1<sup>fd</sup> in *S. pombe* eine ähnliche Funktion erfüllt wie das Adx Homolog Yah1 in *S. cerevisiae* (Lill und Mühlenhoff, 2006), für das eine Rolle in der Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern beschrieben ist, bei der es möglicherweise die Elektronen für die Reduktion von Schwefel zu Sulfid bereitstellt (Schiffler *et al.*, 2004a; Ewen *et al.*, 2008).

Die physiologische Aufgabe von Fdx1 liegt vermutlich ebenfalls in der Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern. Dies legt sowohl der genomische Kontext als auch die phylogenetische Analyse nahe.

Generell werden drei Systeme unterschieden, die für die Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern verantwortlich sind. Dabei handelt es sich um die NIF (Nitrogen Fixation), SUF (mobilization of Sulfur) und ISC (Iron-Sulfur-Cluster formation) Maschinerien, die in allen drei Reichen gefunden wurden. Das NIF System kommt in stickstofffixierenden Organismen vor und ist für die Biosynthese der Eisen-Schwefel-Cluster des Nitrogenase Systems verantwortlich. Das SUF System übernimmt bei vielen Bakterien die generelle Eisen-Schwefel-Cluster Biogenese unter Eisenmangelbedingungen und bei oxidativem Stress; es scheint außerdem das einzige für die Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern verantwortliche System bei den Archaea und den Cyanobakterien sowie bei vielen Gram-positiven, pathogenen und thermophilen Bakterien zu sein. Darüber hinaus stammt in Übereinstimmung mit der Endosymbiontentheorie auch die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese Maschinerie in

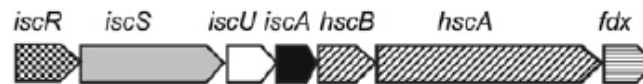
Chloroplasten vom bakteriellen SUF System ab. Das isc System schließlich ist das generelle “housekeeping” System für die Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern in (insbesondere Gram-negativen) Eubakterien und stellt daneben auch die Basis der mitochondrialen Eisen-Schwefel Cluster Biosynthese Maschinerie dar (Takahashi und Tokumoto, 2002; Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Fontecave und Ollagnier-de-Choudens, 2008).

Alle drei Systeme beinhalten eine Cystein Desulfurase (NifS, SufS und IscS), die den benötigten Schwefel für die Cluster Biosynthese liefert, sowie mindestens ein *Scaffold* Protein (IscU, NifU, NFU, SufU und SufA, IscU (eukaryotisch ISU), IscA (eukaryotisch ISA)), an dem die Eisen-Schwefel-Cluster assembliert werden. Darüber hinaus sind in den unterschiedlichen Systemen noch weitere Proteinkomponenten beteiligt (Abbildung 4.4.1), von denen hier allerdings nur die Komponenten des isc Systems besprochen werden sollen.



#### Abbildung 4.4.1: Schematische Darstellung der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese

Die zentrale Komponente des jeweiligen Systems ist das *Scaffold* Protein, an dem der Cluster aus Schwefel von der Cystein Desulfurase und Eisen von einem Eisendonator (isc: mitochondrial: Frataxin bzw. *E. coli*: CyaY oder IscA) gebildet wird. Der Cluster wird anschließend vom *Scaffold* Protein unter Mitwirkung weiterer Proteine auf das eigentliche Zielprotein übertragen. Reproduziert mit Genehmigung von Elsevier aus (Arch. Biochem. Biophys.), (Vol 474), Fontecave und Ollagnier-de-Choudens, „Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer“, (226-237), (2008).



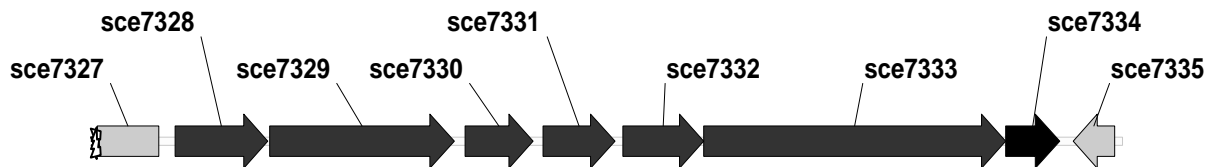
**Abbildung 4.4.2: Schematische Darstellung des *isc* Operons in *E. coli* und *A. vinelandii***

Das Operon enthält die Gene für den negativen Regulator IscR, die Cysteindesulfurase IscS, die *Scaffold* Proteine IscU und IscA, die beiden Chaperone HscB und HscA sowie ein Ferredoxin. Reproduziert mit Genehmigung aus Bandyopadhyay et al. (2008) (Biochem. Soc. Trans.), (Vol. 36), (1112-1119).

Fast alle bislang bekannten Genome Gram-negativer Bakterien zeigen dieselbe genomische Organisation der *isc* Gene (Frazzon *et al.*, 2002). Das typische *isc* Operon umfasst wie bei *Escherichia coli* und *Azotobacter vinelandii* (Abbildung 4.4.2) sieben Gene: ***iscR-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx*** (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Dabei ist IscS die Cystein Desulfurase, IscU das Haupt-*Scaffold* Protein und IscA ein weiteres potentielles *Scaffold* Protein, für das aber auch andere Funktionen wie beispielsweise die des Eisendonors diskutiert werden. HscA und HscB sind für die Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese essentielle molekulare Chaperone, die mit DnaK und DnaJ eng verwandt sind, aber nur IscU als Substrat verwenden (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Das IscR Protein reguliert die Expression des Operons je nachdem ob es in Apoform vorliegt oder einen [2Fe-2S]-Cluster inkorporiert hat (Frazzon *et al.*, 2002). Das *fdx* Gen schließlich kodiert ein [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxin, dessen Funktion lange Zeit unklar war. Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass durch Reduktion von zwei [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Clustern an IscU durch Fdx ein [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster zwischen zwei IscU Proteinen gebildet werden kann (Fontecave und Ollagnier-de-Choudens, 2008).

Betrachtet man das putative *isc* Operon in *Sorangium cellulosum* So ce56 (Abbildung 4.4.3), so stellt man fest, dass dieselbe Genanordnung wie im *E. coli* *isc* Operon vorliegt. Das als Transkriptionsregulator der MerR-Familie annotierte Genprodukt von *sce7328* entspricht dem Regulator IscR, *sce7329* ist homolog zu *iscS*; es folgen die Gene der beiden *Scaffold* Proteine *sce7330* (*iscU*) und *sce7331* (*iscA*) sowie die Gene des Kochaperons HscB (*sce7332*) und des Chaperons HscA (*sce7333*). Den Abschluss des Operons bildet das *fdx* Gen *sce7334*.

Der putative Eisendonor des *isc* Systems, das mitochondriale Frataxin (UniProt Q16595) bzw. sein bakterielles Homolog CyaY (UniProt P27838), ist wie auch bei *E. coli* nicht Teil des Operons. Eine „Blast“ Suche im Genom von *Sorangium cellulosum* So ce56 führte aber zur Identifikation des Gens *sce2549*, dessen vorhergesagtes Genprodukt eng verwandt mit CyaY zu sein scheint und damit als Eisendonor des myxobakterielle *isc* System in Frage kommt.



**Abbildung 4.4.3 Darstellung des putativen isc Operons in *Sorangium cellulosum* So ce56**

Die Gene, die vermutlich dem isc Operon angehören, sind in dunkelgrau dargestellt. Sie sind folgendermaßen annotiert: sce7328: Transkriptionsregulator MerR-Familie, sce7329: Cysteindesulfurase NifS, sce7330: iscU / NifU artiges Protein, sce7331: sufA, sce7332: Cochaperon Hsc20/ Chaperon DNAJ, sce7333: Chaperon HscA, sce7334 putatives [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxin = Fdx1

Die Einordnung über den genomischen Kontext platziert Fdx1 bei den isc-Typ Ferredoxinen. Wie bereits erwähnt, wird dies auch durch die experimentell ermittelten Eigenschaften des Ferredoxins gestützt, da sich die Eigenschaften von Adx-Typ Ferredoxinen und isc-Typ Ferredoxinen stark ähneln (Mitou *et al.*, 2003; Schiffler *et al.*, 2004a). So zeigt beispielsweise das im isc Operon kodierte [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxin aus *E. coli* eine Aminosäureidentität von etwa 30% mit maturem bovinem Adx (Tabelle 4.4.1) und auch seine spektralen Eigenschaften stimmen sowohl mit Adx als auch mit Etp1<sup>fd</sup> und Fdx1 weitgehend überein (Tabelle 4.4.2). Auffällig ist allerdings, dass beim Redoxpotential eine deutliche Diskrepanz zwischen Adx und den isc-Typ Ferredoxinen auftritt, wobei die isc-Typ Ferredoxine durch negativere Redoxpotentiale als die Vertebraten-Typ Ferredoxine gekennzeichnet sind (Mitou *et al.*, 2003). Beim *E. coli* Fdx wurde spekuliert, dass das stark negative Redoxpotential die Reduktion von Fe<sup>3+</sup> zu Fe<sup>2+</sup> und S<sup>0</sup> to S<sup>2-</sup> für die Eisen-Schwefel-Cluster Bildung erleichtern könnte (Takahashi und Nakamura, 1999).

Die Hypothese, dass Fdx1 in *Sorangium cellulosum* So ce56 primär nicht mit Cytochrom P450 Systemen assoziiert ist, lässt die Tatsache, dass Fdx1 (in Verbindung mit der myxobakteriellen Ferredoxin Reduktase FdRB) Adx *in vitro* ersetzen und den CYP11A1 abhängigen Substratumsatz unterstützen kann, noch interessanter erscheinen. Denn Fdx1 ist bislang das erste bakterielle Ferredoxin, für das diese Aktivität beschrieben wurde. Selbst Pdx, das Ferredoxin des wohl am intensivsten studierten bakteriellen Klasse I Cytochrom P450 Systems (CYP101 aus *Pseudomonas putida*), ist nicht in der Lage, Adx funktionell zu ersetzen, da nur das erste Elektron auf das heterologe Cytochrom P450 übertragen wird (Tyson *et al.*, 1972; Lipscomb *et al.*, 1976; Schiffler und Bernhardt, 2003). Bislang war nur ein einziges Ferredoxin aus einem einzelligen Organismus, Etp1<sup>fd</sup>, bekannt, dass Adx im CYP11A1 abhängigen Substratumsatz ersetzen kann. Im Gegensatz zu Fdx1 kann Etp1<sup>fd</sup>

allerdings Elektronen sowohl von der bovinen AdR (Schiffler *et al.*, 2004a) als auch von der endogenen Spalthefe Ferredoxin Reduktase Arh1 (Ewen *et al.*, 2008) aufnehmen.

**Tabelle 4.4.1: Identität der Aminosäurereste verschiedener [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine**

Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm „ALIGN Query using sequence data“ (Pearson *et al.*, 1997) (GENESTREAM network server IGH Montpellier FRANCE, <http://xylian.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>) durchgeführt.

	<b>Fdx1</b> ( <i>S. cellulosum</i> )	<b>Adx</b> ( <i>B. taurus</i> )	<b>Etp1<sup>fd</sup></b> ( <i>S. pombe</i> )	<b>Yah1</b> ( <i>S. cerevisiae</i> )
<b>Adx</b> ( <i>B. taurus</i> )	24,8%			
<b>Etp1<sup>fd</sup></b> ( <i>S. pombe</i> )	35,8%	39,0%		
<b>Yah1</b> ( <i>S. cerevisiae</i> )	29,6%	34,7%	51,9%	
<b>EcFdx</b> ( <i>E. coli</i> )	35,2%	30,3%	40,2%	37,3%

**Tabelle 4.4.2: Biophysikalische Eigenschaften verschiedener [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine**

<b>Ferredoxin</b> (Spezies)	<b>Fdx1</b> ( <i>S. cellulosum</i> )	<b>Adx</b> ( <i>B. taurus</i> )	<b>Etp1<sup>fd</sup></b> ( <i>S. pombe</i> )	<b>EcFdx</b> ( <i>E. coli</i> )
<b>UV/Vis</b>	455 nm 411 nm 321 nm	455 nm 414 nm 320 nm *	458 nm 415 nm 310 nm –350 nm **	460 nm 416 nm 325 nm ****
<b>ESR</b>	g <sub>1</sub> = 2,02 g <sub>2</sub> = 1,94 g <sub>3</sub> = 1,93	g <sub>1</sub> = 2,02 g <sub>2</sub> = 1,94 **	g <sub>1</sub> = 2,03 g <sub>2</sub> = 1,94 **	g <sub>1</sub> = 2,02 g <sub>2</sub> = 1,94 ****
<b>Redox-potential</b>	-362 mV	-273 mV ***	-353 mV **	- 383 mV / - 379 mV ****

\* (Uhlmann und Bernhardt, 1995)

\*\* (Schiffler *et al.*, 2004a)

\*\*\* (Grinberg *et al.*, 2000)

\*\*\*\* (Knoell und Knappe, 1974)



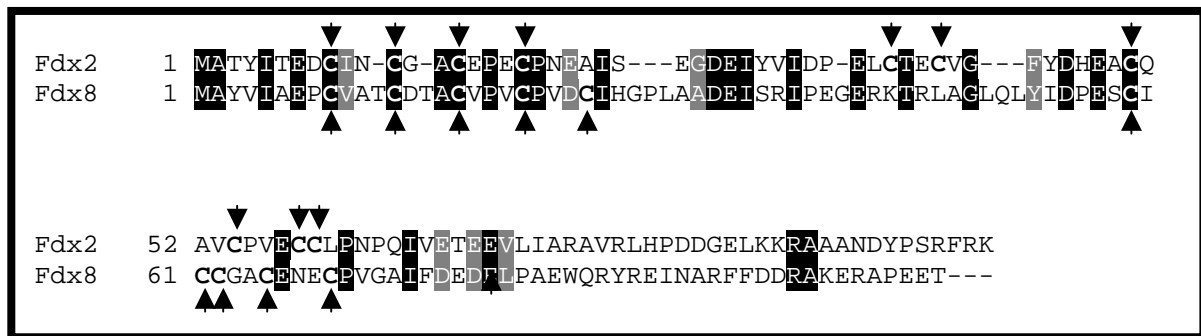
Die Beobachtung, dass es sich bei den bislang einzigen Ferredoxinen aus Einzellern, die Adx funktionell ersetzen können, um Proteine handelt, deren physiologische Rolle vermutlich in der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese liegt, unterstützt die Hypothese, dass Adx noch eine zweite, bislang unbekannte Funktion bei der Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern erfüllen könnte (Lange *et al.*, 2000). Die gezeigte Verwandtschaft von Adx und Etp1<sup>fd</sup> bzw. Fdx1 ist auch vom evolutionären Standpunkt her hochinteressant, da sich die Frage stellt, in wieweit prokaryotische und eukaryotische mitochondriale isc Systeme konserviert und in ihren Komponenten austauschbar sind. Dieser Fragestellung wird im Moment im Rahmen eines Vigoni Projektes in Kooperation mit Professor Franco Bonomi und Stefania Iametti (associate professor) an der Universität Mailand nachgegangen.

#### 4.5. Fdx2 und Fdx8

Die *S. cellulorum* So ce56 [3Fe-4S]-Cluster Ferredoxine Fdx2 und Fdx8 sind beide in der Lage, Elektronen von der FdRB (und auch in geringerem Maß von der FdRA) auf CYP260A1 zu übertragen. CYP260A1 ist ein autologes Cytochrom P450, über dessen Funktion und Substrate *in vivo* bislang nichts bekannt ist. *In vitro* konnten jedoch bereits einige Substrate identifiziert werden, die von CYP260A1 umgesetzt werden (Khatri, 2009). Die durch eine phylogenetische Analyse festgestellte Verwandtschaft zu Terpen-umsetzenden Cytochromen P450 führte zur Identifikation des Sesquiterpens Nootkaton, das in der vorliegenden Arbeit als Substrat bei *in vitro* Rekonstitutionsassays Verwendung fand. Darüber hinaus ergab ein Screening einer Sammlung verschiedener chemischer Verbindungen, dass CYP260A1 auch Steroide binden kann. Eine Umsetzung verschiedener Steroide wurde mittlerweile ebenfalls nachgewiesen (Khatri, 2009). Interessanterweise stellen die Myxobakterien eine der wenigen Bakteriengruppen dar, bei denen die Bildung von Steroiden beobachtet werden konnte, wobei bislang unklar ist, welche Funktion sie in Myxobakterien erfüllen (Bode und Müller, 2003; Bode *et al.*, 2003).

Wie im Ergebnisteil dargestellt, waren die Gesamtproduktbildungsrate wie auch die Produktverteilung bei der CYP260A1 abhängigen Umsetzung von Nootkaton bei Verwendung der Elektronentransferketten FdRB-Fdx2 und FdRB-Fdx8 annähernd gleich.

Bei beiden Ferredoxinen handelt es sich um [3Fe-4S]-Cluster Ferredoxine, die ein für Nicht-[2Fe-2S]-Cluster Ferredoxine typisches UV/Vis-Spektrum aufweisen. Betrachtet man die beiden Proteine jedoch näher, fallen einige deutliche Unterschiede und charakteristische Eigenschaften auf. Obwohl beide Ferredoxine die FdRB der FdRA als Elektronendonoren vorzuziehen scheinen und beide in der Lage sind, Elektronen an CYP260A1 weiterzuleiten, weisen sie eine Sequenzidentität von nur 29,5 % (ermittelt mit „ALIGN Query using sequence data“ (Pearson *et al.*, 1997)) auf. Besonders im C-terminalen Bereich gibt es kaum Sequenzübereinstimmungen bei den beiden Proteinen (Abbildung 4.5.1); es fällt allerdings auf, dass die Anzahl der Cysteinreste bei beiden Ferredoxinen identisch (jeweils 10) ist, und sowohl im N-terminalen Bereich als auch in der Mitte eine Häufung von Cysteinresten auftritt. Bei beiden Ferredoxinen tritt einmal das klassische Sequenzmotiv für die Bindung eines Eisen-Schwefel-Clusters  $CX_1X_2CX_3X_4CX_5X_6X_7CP$  (Beinert, 1990) auf, das andere Mal liegt das Motiv in abgewandelter Form vor.



**Abbildung 4.5.1: Alignment der *S. cellulosum* So ce56 [3Fe-4S]-Cluster Ferredoxine Fdx2 und Fdx8**

Das gezeigte Alignment wurde mit den Programmen „ClustalW“ und „Boxshade“ generiert. Identische Aminosäurereste sind schwarz unterlegt, konservierte Reste grau. Die Positionen der Cysteinreste sind durch Pfeilspitzen markiert. Fdx2 weist die beiden Sequenzen CXXCXXCXXXCP und CXXCXXXXXXXXXXCXXXCP auf, wobei bekannt ist, dass zwischen X<sub>3</sub> und X<sub>4</sub> bis zu 6 weitere Reste liegen können (Beinert, 1990). Fdx8 hingegen zeigt zuerst das abgewandelte Motiv CXXXCXXXCXXXCP und dann erst die klassische Sequenz CXCCXXCXXXCP.

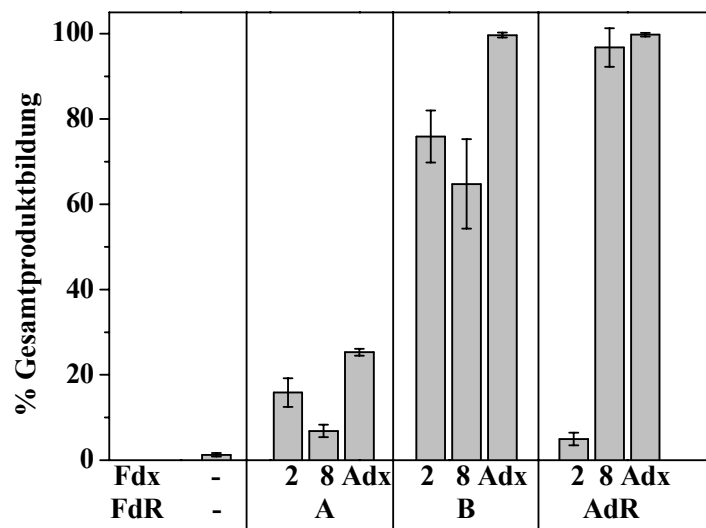
Fdx2 weist im Vergleich zu Fdx8 eine schwächere Absorption und einen entsprechend niedrigeren Extinktionskoeffizienten bei 400 nm auf. Für dieses Phänomen sind zwei Erklärungen denkbar: entweder liegt das Ferredoxin teilweise reduziert vor oder aber die Probe enthält weniger Eisen. Für beide Erklärungsmöglichkeiten wurden im Rahmen dieser Arbeit Indizien gefunden. Das Verhalten in der ESR-Spektroskopie, bei der ein deutliches Signal erst nach Zugabe des Oxidationsmittels Ferricyanid gemessen wurde, spricht dafür, dass Fdx2 nach der Reinigung trotz Luftkontakt größtenteils in reduzierter Form vorliegt. Die ICP-OES Messung ergab einen Eisengehalt, der nur etwa halb so hoch wie erwartet ist. Es besteht also die Möglichkeit, dass nur ein Teil des Fdx2 einen Cluster trägt. Eine Mischung von Holo- und Apoprotein könnte eventuell das Auftreten von zwei Banden bei der IEF erklären. Allerdings ist der Ladungsunterschied durch den Eisen-Schwefel-Cluster sehr gering, so dass eine Trennung von Holo- und Apoprotein in der IEF eher unwahrscheinlich ist und die beiden Proteinbanden wohl eher auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen sind. Eine andere Erklärung für den Eisengehalt von 1,5 mol Eisen pro mol Fdx2 könnte darin liegen, dass ein [3Fe-4S]-Cluster von zwei Ferredoxinmolekülen gebunden wird. Dies stünde auch im Einklang mit der in der SDS-PAGE gemachten Beobachtung, dass die Fdx2 Bande bei etwa 24 kD und damit einem Wert liegt, der dem Doppelten des theoretischen Molekulargewichts von 12 kD entspricht. Zwar wurde auch von anderen

Ferredoxinen berichtet, dass sie Dimere bilden können (Schiffler *et al.*, 2004a), aber diese enthielten jeweils einen Eisen-Schwefel-Cluster pro Monomer. Eine Anordnung mit nur einem Eisen-Schwefel-Cluster pro Dimer ist bei Ferredoxinen nicht üblich, wurde jedoch bei anderen Proteinen wie IscU Proteinen und Glutaredoxinen, die als *Scaffold*-Proteine bei der Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern bzw. beim Transfer der neu synthetisierten Cluster eine Rolle spielen, beschrieben (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Eine andere Erklärung für die Diskrepanz von ermittelter Eisen- und Proteinkonzentration könnte auch in einer unvollständigen Herauslösung des Eisens aus Fdx2 bei der Probenvorbereitung für die ICP-OES liegen.

Um zu überprüfen, ob das in dieser Arbeit verwendete Fdx2 auch die korrekte Form des myxobakteriellen Ferredoxins darstellt, sollte eine zweite Form – Fdx2L – kloniert und exprimiert werden. Für diese Form wurde ein potentieller alternativer Startpunkt des *fdx2* Gens angenommen, der zu einem Genprodukt führt, das am N-Terminus 35 zusätzliche Aminosäuren, inklusive eines zusätzlichen Cysteinrestes (MPSRNRRLPPELTPCGGQASTNERTGVTPENEAKA), aufweist. Es wurden Expressionsplasmide für die Expression des Fdx2L mit *GST*- oder *His<sub>6</sub>-tag* hergestellt, jedoch konnten keine Bedingungen gefunden werden, unter denen eine Expression nachweisbar war. Daher muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei Fdx2 um die korrekte Form des Ferredoxins handelt.

Eine Besonderheit des Fdx8 wurde beim Vergleich des NADPH Verbrauchs und der Gesamtproduktbildung des vollständig rekonstituierten Systems FdRB-Fdx8-CYP260A1 festgestellt. Verglichen mit dem System, das Fdx2 enthält, ist der NADPH Verbrauch des Fdx8 enthaltenden Systems deutlich höher, jedoch ist die Gesamtproduktbildung beider Systeme sehr ähnlich. Dies weist darauf hin, dass im Fdx8 enthaltenden System eine Entkopplung des Elektronentransfers von der Hydroxylierung auftritt. Derartige Entkopplungen, bei denen O<sub>2</sub> zu einem Superoxidradikal reduziert werden kann, sind sowohl aus Klasse I als auch aus Klasse II Cytochrom P450 Systemen bekannt (Hanukoglu *et al.*, 1993; Hanukoglu, 2006). Die Hypothese, dass Fdx8 in hohem Maße Elektronen auf Sauerstoff überträgt, könnte auch zur Erklärung der Diskrepanz der Ergebnisse der NADPH und Cytochrom *c* Tests beitragen, bei denen im NADPH Verbrauchsassay eine auffallend hohe NADPH Oxidationsrate der Kombination Fdx8-FdRB beobachtet wurde. Auch die in der ESR gemachte Beobachtung, dass Fdx8 unter aeroben Bedingungen kaum zu reduzieren ist und sehr schnell reoxidiert spricht für eine Entkopplung im Cytochrom P450 System.

Eine weitere Besonderheit des Fdx8 ist seine Fähigkeit, im *in vitro* Rekonstitutionsassays mit CYP260A1 Elektronen auch von der bovinen AdR aufnehmen zu können. Überraschenderweise scheint der Elektronenfluss von der AdR zum Fdx8 sogar effizienter zu sein, als beim autologen System FdRB-Fdx8 (Abbildung 4.5.2). Damit unterscheidet sich Fdx8 sowohl von Fdx2 als auch von beispielsweise dem [3Fe-4S]-Cluster Ferredoxin Fdmor (Sielaff und Andreesen, 2005a), die beide nicht (oder nur sehr schwach) mit AdR reagieren können und stattdessen auf die Ferredoxin Reduktase aus dem jeweiligen Organismus angewiesen sind. Eine bessere Wechselwirkung zwischen heterologen Ferredoxin und Ferredoxin Reduktase Partnern ist zwar ungewöhnlich, wurde allerdings auch schon beispielsweise bei der AdR aus der Ratte beschrieben, die eine höhere Affinität gegenüber bovinem Adx als gegenüber dem endogenen Adx aus der Ratte aufweist (Sagara *et al.*, 1999).



**Abbildung 4.5.2: Vergleich der CYP260A1 abhängigen Umsetzung von Nootkaton mit unterschiedlichen Kombinationen von myxobakteriellen Ferredoxinen und Ferredoxin Reduktasen sowie den bovinen Proteinen Adx und AdR**

Die Kombinationen Adx-AdR, Adx-FdRB und Fdx8-AdR sind hinsichtlich der Gesamtproduktbildung effizienter als die autologen Kombinationen Fdx2-FdRB und Fdx8-FdRB. Adx kann sehr gut von der myxobakteriellen Reduktase FdRB reduziert werden, interagiert aber auch mäßig gut mit FdRA. Umgekehrt kann nur Fdx8 mit der AdR arbeiten, Fdx2 wird von der mitochondrialen Reduktase fast nicht reduziert.

Mit Hinblick auf das gesamte CYP260A1 System fällt auf, dass die heterologen Kombinationen Adx-AdR und Adx-FdRB effizienter sind als sowohl die Kombination des Fdx8 mit der AdR wie auch die beiden autologen Kombinationen Fdx2-FdRB und Fdx8-FdRB. Dies zeigt sich nicht nur in der höheren Gesamtproduktbildung, sondern auch in dem erhöhten Anteil des dihydroxylierten Nootkaton Produktes. Eine weitere Verschiebung des Produktmusters hin zu mehr dihydroxyliertem Produkt wurde beobachtet (Khatri, 2009), wenn die Elektronentransferkette zu CYP260A1 aus AdR und der verkürzten Adx-Mutante Adx4-108 bestand, für die verbesserte Interaktionen zu den natürlichen Redoxpartnern und eine daraus resultierende erhöhte katalytische Aktivität des Cytochrom P450 Systems beschrieben sind (Bichet *et al.*, 2007). Ähnliche Beobachtungen, dass heterologe Elektronentransferketten eine ebenso hohe oder sogar höhere Effizienz als die endogene Elektronentransportkette aufwiesen, wurden auch bei *Streptomyces* gemacht (Chun *et al.*, 2007). Im Hinblick auf eine mögliche biotechnologische Anwendung ist diese Beobachtung der unterschiedlichen Effizienz verschiedener Fdx-FdR Kombinationen natürlich von großem Interesse, da sich einerseits die Möglichkeit eröffnet, die Reaktion durch Verbesserung des Elektronenflusses zu beschleunigen, und andererseits das Produktmuster durch den Einsatz verschiedener Elektronentransferketten beeinflusst werden kann. Aber auch für die Grundlagenforschung ist das Vorhandensein von vier möglichen autologen Elektronentransportketten (Fdx2-FdRA, Fdx2-FdRB, Fdx8-FdRA und Fdx8-FdRB) interessant, da über diese möglicherweise die Aktivität der myxobakteriellen Cytochrome P450 reguliert werden könnte. In *Streptomyces* wurde bereits vermutet, dass die Menge an verfügbarer Ferredoxin Reduktase den Faktor darstellt, der die Cytochrom P450 Aktivität limitiert (Hussain und Ward, 2003). Bei *Sorangium cellulosum* So ce56 wäre dementsprechend wegen der vier möglichen Kombinationen eine komplexe, auf die jeweiligen Bedürfnisse angepasste Regulation sowohl über die Konzentrationsspiegel der Ferredoxin Reduktasen als auch der Ferredoxine denkbar.

#### 4.6. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Ferredoxine identifiziert, für die eine Interaktion mit Cytochrom P450 Enzymen nachgewiesen werden konnte. Fdx1 war in Kombination mit FdRB in der Lage, die aus Adx und AdR bestehende Elektronentransferkette im CYP11A1 abhängigen Substratumsetzungsassay zu ersetzen, zeigte aber so gut wie keine Aktivität mit dem myxobakteriellen CYP260A1. Aufgrund seiner Sequenz, seiner biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften sowie seinem genomischen Kontext konnte Fdx1 als isc-Typ Ferredoxin eingeordnet werden, dessen physiologische Rolle vermutlich in der Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese liegt. Als Cytochrom P450 System assoziierte Ferredoxine wurden hingegen die beiden [3Fe-4S]-Cluster Ferredoxine Fdx2 und Fdx8 identifiziert, die das autologe CYP260A1 reduzieren und ihrerseits (mit unterschiedlicher Effizienz) von den beiden Ferredoxin Reduktasen FdRA und FdRB reduziert werden konnten. In Kombination mit FdRB zeigten Fdx2 und Fdx8 dabei vergleichbare Aktivitäten mit CYP260A1. Das Vorhandensein multipler Redoxketten in Cytochrom P450 Systemen ist eher ungewöhnlich, da meist ein Elektronenmediatorprotein mit mehreren Cytochrom P450 Enzymen wechselwirken kann. Ein bekanntes Beispiel dafür ist das mitochondriale Adx, das Elektronen an alle adrenalen Steroidhydroxylasen liefert (Hannemann *et al.*, 2007).

Die Rolle der Ferredoxine Fdx3 und Fdx5 hingegen ist nach wie vor unklar. Zwar scheinen sie in der Lage zu sein, Elektronen von FdRA aufzunehmen, auf welches Protein sie diese jedoch übertragen ist nicht bekannt. Da die myxobakteriellen Ferredoxine, die Aktivität in einem Cytochrom P450 System zeigten, jedoch einen deutlich saureren pI aufwiesen, kann aber davon ausgegangen werden, dass Fdx3 und Fdx5 keine Rolle in Cytochrom P450 Systemen spielen. Um die Rolle dieser Proteine herauszufinden wäre es denkbar, DNA-Microarrays einzusetzen, um die Genexpression unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zu verfolgen und so über Parallelen in der Genexpression mögliche Interaktionspartner zu identifizieren. Auch die Herstellung von K.O.-Mutanten wäre denkbar, um die physiologische Funktion dieser Proteine besser einschätzen zu können.

Aber auch im Fall der Redoxproteine, denen eine Funktion zugeordnet werden konnte, wären Experimente mit DNA-Microarrays und K.O.-Mutanten sinnvoll, um die entsprechenden Proteine im Hinblick auf ihre Aufgaben *in vivo* weiter zu charakterisieren. Denn es stellt sich nun die Frage, ob außer CYP260A1 auch die übrigen 20 Cytochrome P450 aus *Sorangium cellulosum* So ce56 von Fdx2 bzw. Fdx8 als Redoxpartner abhängig sind und, wenn dies der

Fall sein sollte, ob alle mit beiden Ferredoxinen gleich gut interagieren können oder ob es Präferenzen für einen Interaktionspartner gibt. Es ist natürlich möglich, die Cytochrome P450 *in vitro* mit den Fdx-FdR Kombinationen zu testen, jedoch besteht dabei das Problem, dass zunächst ein geeignetes Substrat gefunden werden muss. Aber selbst wenn ein solches Substrat – wie im Fall des CYP260A1 – zur Verfügung steht, kann die *in vitro* Rekonstitution keine Auskunft über die physiologische Bedeutung eines CYP Systems geben. Mittels K.O.-Mutanten könnte man hingegen überprüfen, wie sich das Fehlen einer oder mehrerer der Komponenten auf die Myxobakterien und ihr Sekundärmetabolitspektrum auswirkt. Eine geeignete Methode für den Vergleich metabolischer Profile steht dabei mit der LC-MS zur Verfügung (Krug *et al.*, 2008a; Krug *et al.*, 2008b). Mit derartigen Untersuchungen könnte darüber hinaus geklärt werden, ob beispielsweise die FdRA *in vivo* als „Ersatzreduktase“ ein Fehlen der FdRB ausgleichen kann oder ob Fdx2 und Fdx8 sich gegenseitig komplementieren. Eine Analyse der Genexpression über Microarrays könnte zudem interessante Hinweise auf die Regulation der Expression der einzelnen Proteine liefern.

Neben der Grundlagenforschung ist aber auch eine mögliche Anwendung in der Biotechnologie eine Richtung, die weiterverfolgt werden sollte. Cytochrom P450 Enzyme sind an der Bildung vieler potentieller Arzneistoffe und anderer interessanter, chemisch schwer darstellbarer Substanzen beteiligt und daher für eine biotechnologische Anwendung interessant (Guengerich, 2002; Bernhardt, 2006). Da viele Myxobakterien selbst u.a. aufgrund ihrer langen Generationszeit und fehlender Möglichkeiten zur genetischen Manipulation wenig für die biotechnologische Produktion geeignet sind, weicht man oft auf heterologe Wirte aus (Gerth *et al.*, 2003; Weissman und Müller, 2009). So wurde beispielsweise der Epothilon Biosynthesekomplex aus *Sorangium cellulosum* So ce90 in *S. coelicolor* (Tang *et al.*, 2000), *M. xanthus* (Julien und Shah, 2002) und auch *E. coli* (Mutka *et al.*, 2006) erfolgreich exprimiert. Die Verwendung von *E. coli* Bakterien als heterologe Wirte für die Expression von Cytochrom P450 Enzymen ist weit verbreitet; denn obwohl *E. coli* keine eigenen Cytochrom P450 Enzyme besitzt, wird die katalytische Aktivität heterologer Cytochrome P450 in vielen Fällen von den *E. coli* Proteinen Flavodoxin Reduktase und Flavodoxin unterstützt (Jenkins und Waterman, 1994; Jenkins und Waterman, 1998; Hannemann *et al.*, 2007). Die Aktivität des Cytochrom P450 Enzyms kann aber auch durch die Koexpression geeigneter Redoxpartner (wie beispielsweise CYP106A2 mit Adx-AdR (Hannemann *et al.*, 2006)) gewährleistet werden, so dass gezielt Ganzellsysteme für biotechnologische Anwendungen konstruiert werden können. Wie am Beispiel eines CYP11B1 exprimierenden *S. pombe* Stammes gezeigt wurde (Hakki *et al.*, 2008) kann eine solche Koexpression der



Elektronentransferkette darüber hinaus auch zur Steigerung der Enzymaktivität genutzt werden. Daher ist die oftmals vernachlässigte Charakterisierung der Cytochrom P450 Elektronentransferketten ein wichtiger Punkt, um derartige Ganzzellsysteme zu optimieren (Hannemann *et al.*, 2007).

Abschließend betrachtet ist damit zu rechnen, das Cytochrom P450 Systeme aus Myxobakterien in den nächsten Jahren das wissenschaftliche Interesse auf sich ziehen werden, da sie ein vielfältiges Einsatzpotenzial bei der Herstellung neuer Pharmazeutika sowie anderer Feinchemikalien besitzen. Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage für die weitere Untersuchung des *Sorangium cellulosum* So ce56 CYPoms und dessen mögliche biotechnologische Applikation.

## 5. Literaturverzeichnis

- Aliverti A, Pandini V, Pennati A, de Rosa M and Zanetti G (2008). Structural and functional diversity of ferredoxin-NADP(+) reductases. *Arch. Biochem. Biophys.* 16: 16.
- Altmann KH and Gertsch J (2007). Anticancer drugs from nature - natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. *Nat. Prod. Rep.* 24(2): 327-357.
- Altmann K-H, Höfle G, Müller R, Mulzer J and Prantz K (2008). *From Soil to the Clinic: The Epothilones, an Outstanding Family of Anti-Tumor Agents.* Wien, New York, Springer.
- Amersham Biosciences (Edition AA). *GST Gene Fusion System Handbook.*
- Arakawa T, Tsumoto K, Kita Y, Chang B and Ejima D (2007). Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations. *Amino Acids* 33(4): 587-605.
- Bandyopadhyay S, Chandramouli K and Johnson MK (2008). Iron-sulfur cluster biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 36(Pt 6): 1112-1119.
- Barros MH and Nobrega FG (1999). YAH1 of *Saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that codes for a protein homologous to human adrenodoxin. *Gene* 233(1-2): 197-203.
- Batie CJ and Kamin H (1986). Association of ferredoxin-NADP+ reductase with NADP(H) specificity and oxidation-reduction properties. *J. Biol. Chem.* 261(24): 11214-11223.
- Batie CJ, LaHaie E and Ballou DP (1987). Purification and characterization of phthalate oxygenase and phthalate oxygenase reductase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Biol. Chem.* 262(4): 1510-1518.
- Beinert H (1990). Recent developments in the field of iron-sulfur proteins. *Faseb Journal* 4(8): 2483-2491.
- Bell SG, Hoskins N, Xu F, Caprotti D, Rao Z and Wong LL (2006). Cytochrome P450 enzymes from the metabolically diverse bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342(1): 191-196.
- Bellamine A, Mangla AT, Nes WD and Waterman MR (1999). Characterization and catalytic properties of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96(16): 8937-8942.
- Bernhardt R (1996). Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 127: 137-221.
- Bernhardt R (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* 124(1): 128-145.

- Bernhardt R and Waterman MR (2007). Cytochrome P450 and Steroid Hormone Biosynthesis. In: The Ubiquitous Roles of Cytochrome P450 Proteins. Sigel A, Sigel H and Sigel RKO, Eds., John Wiley & Sons, Ltd. 3: 361-396.
- Bian S and Cowan JA (1999). Protein-bound iron–sulfur centers. Form, function, and assembly. *Coordination Chemistry Reviews*(190–192): 1049–1066.
- Bianchi V, Reichard P, Eliasson R, Pontis E, Krook M, Jornvall H and Haggard-Ljungquist E (1993). *Escherichia coli* ferredoxin NADP<sup>+</sup> reductase: activation of *E. coli* anaerobic ribonucleotide reduction, cloning of the gene (*fpr*), and overexpression of the protein. *J. Bacteriol.* 175(6): 1590-1595.
- Bichet A, Hannemann F, Rekowski M and Bernhardt R (2007). A new application of the yeast two-hybrid system in protein engineering. *Protein Eng. Des. Sel.* 20(3): 117-123.
- Black SM, Szklarz GD, Harikrishna JA, Lin D, Wolf CR and Miller WL (1993). Regulation of proteins in the cholesterol side-chain cleavage system in JEG-3 and Y-1 cells. *Endocrinology* 132(2): 539-545.
- Bode HB and Müller R (2003). Possibility of bacterial recruitment of plant genes associated with the biosynthesis of secondary metabolites. *Plant Physiol.* 132(3): 1153-1161.
- Bode HB and Müller R (2006). Analysis of myxobacterial secondary metabolism goes molecular. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33(7): 577-588.
- Bode HB, Wenzel SC, Irschik H, Höfle G and Müller R (2004). Unusual biosynthesis of leupyrrins in the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 43(32): 4163-4167.
- Bode HB, Zeggel B, Silakowski B, Wenzel SC, Reichenbach H and Müller R (2003). Steroid biosynthesis in prokaryotes: identification of myxobacterial steroids and cloning of the first bacterial 2,3(S)-oxidosqualene cyclase from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Mol. Microbiol.* 47(2): 471-481.
- Brzoska K, Meczynska S and Kruszewski M (2006). Iron-sulfur cluster proteins: electron transfer and beyond. *Acta Biochim. Pol.* 53(4): 685-691.
- Buntin K, Rachid S, Scharfe M, Blöcker H, Weissman KJ and Müller R (2008). Production of the antifungal isochromanone ajudazols A and B in *Chondromyces crocatus* Cm c5: biosynthetic machinery and cytochrome P450 modifications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47(24): 4595-5499.
- Bureik M, Schiffler B, Hiraoka Y, Vogel F and Bernhardt R (2002). Functional expression of human mitochondrial CYP11B2 in fission yeast and identification of a new internal electron transfer protein, *etp1*. *Biochemistry* 41(7): 2311-2321.
- Cammack R, Gay E and Shergill JK (1999). Studies of hyperfine interactions in [2Fe-2S] proteins by EPR and double resonance spectroscopy. *Coordination Chemistry Reviews* 190–192: 1003–1022.

- Cammack R, Rao KK, Bargeron CP, Hutson KG, Andrew PW and Rogers LJ (1977). Midpoint redox potentials of plant and algal ferredoxins. *Biochem. J.* 168(2): 205-209.
- Carrillo N and Ceccarelli EA (2003). Open questions in ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase catalytic mechanism. *Eur. J. Biochem.* 270(9): 1900-1915.
- Caspers P, Stieger M and Burn P (1994). Overproduction of bacterial chaperones improves the solubility of recombinant protein tyrosine kinases in *Escherichia coli*. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 40(5): 635-644.
- Chang MC, Eachus RA, Trieu W, Ro DK and Keasling JD (2007). Engineering *Escherichia coli* for production of functionalized terpenoids using plant P450s. *Nat. Chem. Biol.* 3(5): 274-277.
- Chapman SK and Reid GA, Eds. (1999). *Flavoprotein Protocols*. Aus der Serie: Methods in Molecular Biology. Totowa, New Jersey, Humana Press.
- Chatelet C and Meyer J (1999). The [2Fe-2S] protein I (Shetna protein I) from *Azotobacter vinelandii* is homologous to the [2Fe-2S] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 4(3): 311-317.
- Chen YP and Yoch DC (1989). Isolation, characterization, and biological activity of ferredoxin-NAD<sup>+</sup> reductase from the methane oxidizer *Methylosinus trichosporium* OB3b. *J. Bacteriol.* 171(9): 5012-5016.
- Chun YJ, Shimada T, Sanchez-Ponce R, Martin MV, Lei L, Zhao B, Kelly SL, Waterman MR, Lamb DC and Guengerich FP (2007). Electron transport pathway for a *Streptomyces* cytochrome P450: cytochrome P450 105D5-catalyzed fatty acid hydroxylation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Biol. Chem.* 282(24): 17486-17500.
- Chun YJ, Shimada T, Waterman MR and Guengerich FP (2006). Understanding electron transport systems of *Streptomyces cytochrome* P450. *Biochem. Soc. Trans.* 34(Pt 6): 1183-1185.
- Coghlan VM and Vickery LE (1991). Site-specific mutations in human ferredoxin that affect binding to ferredoxin reductase and cytochrome P450<sub>sc</sub>. *J. Biol. Chem.* 266(28): 18606-18612.
- Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR and Barrell BG (2001). Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 409(6823): 1007-1011.

- Cole ST, Grundstrom T, Jaurin B, Robinson JJ and Weiner JH (1982). Location and nucleotide sequence of *frdB*, the gene coding for the iron-sulphur protein subunit of the fumarate reductase of *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 126(1): 211-216.
- Correll CC, Batie CJ, Ballou DP and Ludwig ML (1992). Phthalate dioxygenase reductase: a modular structure for electron transfer from pyridine nucleotides to [2Fe-2S]. Science. 258(5088): 1604-1610.
- Dawid W (2000). Biology and global distribution of myxobacteria in soils. FEMS Microbiol. Rev. 24(4): 403-427.
- De Mot R and Parret AH (2002). A novel class of self-sufficient cytochrome P450 monooxygenases in prokaryotes. Trends Microbiol. 10(11): 502-508.
- Dym O and Eisenberg D (2001). Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. Protein Sci. 10(9): 1712-1728.
- Ewen K (2004). Untersuchungen an einem der bovinen Adrenodoxin Reduktase homologen Protein aus *Schizosaccharomyces pombe*. Diplomarbeit, Fachrichtung Biochemie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Ewen KM, Hannemann F, Khatri Y, Perlova O, Kappl R, Krug D, Hüttermann J, Müller R and Bernhardt R (2009). Genome mining in *Sorangium cellulosum* So ce56 - identification and characterization of the homologous electron transfer proteins of a myxobacterial cytochrome P450. J. Biol. Chem. 20: in press.
- Ewen KM, Schiffler B, Uhlmann-Schiffler H, Bernhardt R and Hannemann F (2008). The endogenous adrenodoxin reductase-like flavoprotein *arh1* supports heterologous cytochrome P450-dependent substrate conversions in *Schizosaccharomyces pombe*. FEMS Yeast Research 8(3): 432-441.
- Faro M, Schiffler B, Heinz A, Nogues I, Medina M, Bernhardt R and Gomez-Moreno C (2003). Insights into the design of a hybrid system between *Anabaena ferredoxin-NADP+ reductase* and bovine adrenodoxin. Eur. J. Biochem. 270(4): 726-735.
- Fillat MF, Borrias WE and Weisbeek PJ (1991). Isolation and overexpression in *Escherichia coli* of the flavodoxin gene from *Anabaena* PCC 7119. Biochem. J. 280(Pt 1): 187-191.
- Finn RD, Mistry J, Schuster-Bockler B, Griffiths-Jones S, Hollich V, Lassmann T, Moxon S, Marshall M, Khanna A, Durbin R, Eddy SR, Sonnhammer EL and Bateman A (2006). Pfam: clans, web tools and services. Nucleic Acids Res. 34(Database issue): D247-251.
- Fontecave M and Ollagnier-de-Choudens S (2008). Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer. Arch. Biochem. Biophys. 474(2): 226-237.
- Foster RP and Wilson LD (1975). Purification and characterization of adrenodoxin reductase from bovine adrenal cortex. Biochemistry 14(7): 1477-1484.

- Fraaije MW and Mattevi A (2000). Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. *Trends Biochem. Sci.* 25(3): 126-132.
- Frank B, Knauber J, Steinmetz H, Scharfe M, Blöcker H, Beyer S and Müller R (2007a). Spiroketal polyketide formation in *Sorangium*: identification and analysis of the biosynthetic gene cluster for the highly cytotoxic spirangienes. *Chem. Biol.* 14(2): 221-233.
- Frank B, Wenzel SC, Bode HB, Scharfe M, Blöcker H and Müller R (2007b). From genetic diversity to metabolic unity: studies on the biosynthesis of aurafurones and aurafuron-like structures in myxobacteria and streptomycetes. *J. Mol. Biol.* 374(1): 24-38.
- Frazzon J, Fick JR and Dean DR (2002). Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process. *Biochem. Soc. Trans.* 30(4): 680-685.
- Freeman MR, Dobritsa A, Gaines P, Segraves WA and Carlson JR (1999). The dare gene: steroid hormone production, olfactory behavior, and neural degeneration in *Drosophila*. *Development.* 126(20): 4591-4602.
- Fregel R, Rodriguez V and Cabrera VM (2008). Microwave improved *Escherichia coli* transformation. *Lett. Appl. Microbiol.* 46(4): 498-499.
- Fujinaga J and Meyer J (1993). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the [2Fe-2S] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192(3): 1115-1122.
- Gaitatzis N, Kunze B and Müller R (2005). Novel insights into siderophore formation in myxobacteria. *Chembiochem.* 6(2): 365-374.
- Gaitatzis N, Silakowski B, Kunze B, Nordsiek G, Blöcker H, Höfle G and Müller R (2002). The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel type of modular polyketide synthase. *J. Biol. Chem.* 277(15): 13082-13090.
- Gassner GT, Ludwig ML, Gatti DL, Correll CC and Ballou DP (1995). Structure and mechanism of the iron-sulfur flavoprotein phthalate dioxygenase reductase. *Faseb J.* 9(14): 1411-1418.
- Gerth K and Müller R (2005). Moderately thermophilic Myxobacteria: novel potential for the production of natural products isolation and characterization. *Environ. Microbiol.* 7(6): 874-880.
- Gerth K, Pradella S, Perlova O, Beyer S and Müller R (2003). Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities-past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *J. Biotechnol.* 106(2-3): 233-253.
- Goldman BS, Nierman WC, Kaiser D, Slater SC, Durkin AS, Eisen JA, Ronning CM, Barbazuk WB, Blanchard M, Field C, Halling C, Hinkle G, Iartchuk O, Kim HS, Mackenzie C, Madupu R, Miller N, Shvartsbeyn A, Sullivan SA, Vaudin M, Wiegand

- R and Kaplan HB (2006). Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103(41): 15200-15205.
- Gonip G, Zöllner A, Lisurek M, Velazquez-Campoy A, Pinto S, Gomez-Moreno C, Hannemann F, Bernhardt R and Medinap M (2009). Cyanobacterial electron carrier proteins as electron donors to CYP106A2 from *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Biochim. Biophys. Acta* 24: 24.
- Green AJ, Munro AW, Cheesman MR, Reid GA, von Wachenfeldt C and Chapman SK (2003). Expression, purification and characterisation of a *Bacillus subtilis* ferredoxin: a potential electron transfer donor to cytochrome P450. *J. Inorg. Biochem.* 93(1-2): 92-99.
- Greer S and Perham RN (1986). Glutathione reductase from *Escherichia coli*: cloning and sequence analysis of the gene and relationship to other flavoprotein disulfide oxidoreductases. *Biochemistry.* 25(9): 2736-2742.
- Grinberg AV, Hannemann F, Schiffler B, Müller J, Heinemann U and Bernhardt R (2000). Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties. *Proteins* 40(4): 590-612.
- Guengerich FP (2002). Cytochrome P450 enzymes in the generation of commercial products. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1(5): 359-366.
- Guigliarelli B and Bertrand P (1999). Application of EPR spectroscopy to the structural and functional study of iron - sulfur proteins. *Adv. Inorg. Chem.* 47: 421-497.
- Hakki T, Zearo S, Dragan CA, Bureik M and Bernhardt R (2008). Coexpression of redox partners increases the hydrocortisone (cortisol) production efficiency in CYP11B1 expressing fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biotechnol.* 133(3): 351-359.
- Hannemann F, Bera AK, Fischer B, Lisurek M, Teuchner K and Bernhardt R (2002a). Unfolding and conformational studies on bovine adrenodoxin probed by engineered intrinsic tryptophan fluorescence. *Biochemistry* 41(36): 11008-11016.
- Hannemann F, Bichet A, Ewen KM and Bernhardt R (2007). Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1770(3): 330-344.
- Hannemann F, Schiffler B, Iametti S, Bonomi F and Bernhardt R (2002b). The adrenodoxin-like ferredoxin Etp1fd of *S. pombe* shows an unexpected stability. Conference on Fe/S proteins: Biogenesis, Structure, Function, Pathogenesis and Evolution, Philipps-Universität Marburg.
- Hannemann F, Virus C and Bernhardt R (2006). Design of an *Escherichia coli* system for whole cell mediated steroid synthesis and molecular evolution of steroid hydroxylases. *J. Biotechnol.* 25: 25.

- Hanukoglu I (2006). Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metab. Rev.* 38(1-2): 171-196.
- Hanukoglu I and Gutfinger T (1989). cDNA sequence of adrenodoxin reductase. Identification of NADP-binding sites in oxidoreductases. *Eur. J. Biochem.* 180(2): 479-84.
- Hanukoglu I, Rapoport R, Weiner L and Sklan D (1993). Electron leakage from the mitochondrial NADPH-adrenodoxin reductase-adrenodoxin-P450<sub>scc</sub> (cholesterol side chain cleavage) system. *Arch. Biochem. Biophys.* 305(2): 489-498.
- Hasumi H, Nakamura S, Koga K, Yoshizumi H, Parcels JH and Kimura T (1982). Further physicochemical studies on the complex formation between iron-sulfur proteins and flavoproteins from spinach chloroplast and beef adrenal cortex electron-transfer systems. *J. Biochem.* 91(1): 135-141.
- Haudenschild C, Schalk M, Karp F and Croteau R (2000). Functional expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 379(1): 127-136.
- Hawkes DB, Adams GW, Burlingame AL, Ortiz de Montellano PR and De Voss JJ (2002). Cytochrome P450(cin) (CYP176A), isolation, expression, and characterization. *J. Biol. Chem.* 277(31): 27725-27732.
- Heinz A, Hannemann F, Müller JJ, Heinemann U and Bernhardt R (2005). The interaction domain of the redox protein adrenodoxin is mandatory for binding of the electron acceptor CYP11A1, but is not required for binding of the electron donor adrenodoxin reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338(1): 491-498.
- Holden HM, Jacobson BL, Hurley JK, Tollin G, Oh BH, Skjeldal L, Chae YK, Cheng H, Xia B and Markley JL (1994). Structure-function studies of [2Fe-2S] ferredoxins. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26(1): 67-88.
- Huang K, Tu SI and Wang JH (1969). Stabilized flavin radical in chloroplast NADP<sup>+</sup> reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34(1): 48-52.
- Hunter DJ, Roberts GA, Ost TW, White JH, Müller S, Turner NJ, Flitsch SL and Chapman SK (2005). Analysis of the domain properties of the novel cytochrome P450 RhF. *FEBS Lett.* 579(10): 2215-2220.
- Hussain HA and Ward JM (2003). Enhanced heterologous expression of two *Streptomyces griseolus* cytochrome P450s and *Streptomyces coelicolor* ferredoxin reductase as potentially efficient hydroxylation catalysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(1): 373-382.
- Ingelman M, Bianchi V and Eklund H (1997). The three-dimensional structure of flavodoxin reductase from *Escherichia coli* at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 268(1): 147-157.



- Isas JM, Yannone SM and Burgess BK (1995). *Azotobacter vinelandii* NADPH:ferredoxin reductase cloning, sequencing, and overexpression. *J. Biol. Chem.* 270(36): 21258-21263.
- Itoh S, Iemura O, Yamada E, Yoshimura T, Tsujikawa K, Kohama Y and Mimura T (1995). cDNA cloning of mouse ferredoxin reductase from kidney. *Biochim. Biophys. Acta.* 1264(2): 159-162.
- Iverson TM, Luna-Chavez C, Cecchini G and Rees DC (1999). Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science* 284(5422): 1961-1966.
- Jackson CJ, Lamb DC, Marczylo TH, Warrilow AGS, Manning NJ, Lowe DJ, Kelly DE and Kelly SL (2002). A Novel Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase/Ferredoxin Fusion Protein (MCCYP51FX) from *Methylococcus capsulatus* Represents a New Class of the Cytochrome P450 Superfamily. *J. Biol. Chem.* 277(49): 46959-46965.
- Jackson RG, Rylott EL, Fournier D, Hawari J and Bruce NC (2007). Exploring the biochemical properties and remediation applications of the unusual explosive-degrading P450 system XplA/B. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 104(43): 16822-16827.
- Jacquot JP, Rivera-Madrid R, Marinho P, Kollarova M, Le Marechal P, Miginiac-Maslow M and Meyer Y (1994). *Arabidopsis thaliana* NAPHP thioredoxin reductase. cDNA characterization and expression of the recombinant protein in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 235(4): 1357-1363.
- Jarrett JT and Wan JT (2002). Thermal inactivation of reduced ferredoxin (flavodoxin):NADP<sup>+</sup> oxidoreductase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 529(2-3): 237-242.
- Jenkins CM, Genzor CG, Fillat MF, Waterman MR and Gomez-Moreno C (1997). Negatively charged *Anabaena* flavodoxin residues (Asp144 and Glu145) are important for reconstitution of cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase activity. *J. Biol. Chem.* 272(36): 22509-22513.
- Jenkins CM and Waterman MR (1994). Flavodoxin and NADPH-flavodoxin reductase from *Escherichia coli* support bovine cytochrome P450c17 hydroxylase activities. *J. Biol. Chem.* 269(44): 27401-27408.
- Jenkins CM and Waterman MR (1998). NADPH-flavodoxin reductase and flavodoxin from *Escherichia coli*: characteristics as a soluble microsomal P450 reductase. *Biochemistry* 37(17): 6106-6113.
- Jennewein S, Park H, DeJong JM, Long RM, Bollon AP and Croteau RB (2005). Coexpression in yeast of *Taxus* cytochrome P450 reductase with cytochrome P450 oxygenases involved in Taxol biosynthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 89(5): 588-598.
- Johnson DC, Dean DR, Smith AD and Johnson MK (2005). Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 247-281.

- Julien B and Shah S (2002). Heterologous expression of epothilone biosynthetic genes in *Myxococcus xanthus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(9): 2772-2778.
- Karplus PA, Daniels MJ and Herriott JR (1991). Atomic structure of ferredoxin-NADP+ reductase: prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science* 251(4989): 60-66.
- Karplus PA and Faber HR (2004). Structural Aspects of Plant Ferredoxin : NADP(+) Oxidoreductases. *Photosynth. Res.* 81(3): 303-315.
- Karplus PA, Walsh KA and Herriott JR (1984). Amino acid sequence of spinach ferredoxin:NADP+ oxidoreductase. *Biochemistry.* 23(26): 6576-6583.
- Khatri Y (2009). The Cytochrome P450 complement of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56 and characterization of two members, CYP109D1 and CYP260A1. Dissertation, Fachrichtung Biochemie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Kimmich N, Das A, Sevrioukova I, Meharena Y, Sligar SG and Poulos TL (2007). Electron transfer between cytochrome P450cin and its FMN-containing redox partner, cindoxin. *J. Biol. Chem.* 282(37): 27006-27011.
- Kirby J and Keasling JD (2008). Metabolic engineering of microorganisms for isoprenoid production. *Nat. Prod. Rep.* 25(4): 656-661.
- Kitagawa T, Sakamoto H, Sugiyama T and Yamano T (1982). Formation of the semiquinone form in the anaerobic reduction of adrenodoxin reductase by NADPH. Resonance Raman, EPR, and optical spectroscopic evidence. *J. Biol. Chem.* 257(20): 12075-12080.
- Knoell HE and Knappe J (1974). *Escherichia coli* ferredoxin, an iron-sulfur protein of the adrenodoxin type. *Eur. J. Biochem.* 50(1): 245-252.
- Krohne-Ehrich G, Schirmer RH and Untucht-Grau R (1977). Glutathione reductase from human erythrocytes. Isolation of the enzyme and sequence analysis of the redox-active peptide. *Eur. J. Biochem.* 80(1): 65-71.
- Krug D, Zurek G, Revermann O, Vos M, Velicer GJ and Müller R (2008a). Discovering the hidden secondary metabolome of *Myxococcus xanthus*: a study of intraspecific diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(10): 3058-3068.
- Krug D, Zurek G, Schneider B, Garcia R and Müller R (2008b). Efficient mining of myxobacterial metabolite profiles enabled by liquid chromatography-electrospray ionisation-time-of-flight mass spectrometry and compound-based principal component analysis. *Anal. Chim. Acta.* 624(1): 97-106.
- Kubo A, Sano T, Saji H, Tanaka K, Kondo N and Tanaka K (1993). Primary Structure and Properties of Glutathione Reductase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 34(8): 1259-1266.

- Kumar S, Tamura K and Nei M (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5(2): 150-163.
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Codani JJ, Connerton IF, Danchin A and et al. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* 390(6657): 249-256.
- Lacour T, Achstetter T and Dumas B (1998). Characterization of recombinant adrenodoxin reductase homologue (Arh1p) from yeast. Implication in in vitro cytochrome p45011beta monooxygenase system. *J. Biol. Chem.* 273(37): 23984-23992.
- Lacour T and Ohkawa H (1999). Engineering and biochemical characterization of the rat microsomal cytochrome P450A1 fused to ferredoxin and ferredoxin-NADP(+) reductase from plant chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1433(1-2): 87-102.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lamb DC, Skaug T, Song HL, Jackson CJ, Podust LM, Waterman MR, Kell DB, Kelly DE and Kelly SL (2002). The cytochrome P450 complement (CYPome) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Biol. Chem.* 277(27): 24000-24005.
- Lambeth JD and Kamin H (1976). Adrenodoxin reductase. Properties of the complexes of reduced enzyme with NADP+ and NADPH. *J. Biol. Chem.* 251(14): 4299-4306.
- Lange H, Kaut A, Kispal G and Lill R (2000). A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97(3): 1050-1055.
- Lawson RJ, von Wachenfeldt C, Haq I, Perkins J and Munro AW (2004). Expression and characterization of the two flavodoxin proteins of *Bacillus subtilis*, YkuN and YkuP: biophysical properties and interactions with cytochrome P450 BioI. *Biochemistry* 43(39): 12390-12409.
- Leadbeater C, McIver L, Campopiano DJ, Webster SP, Baxter RL, Kelly SM, Price NC, Lysek DA, Noble MA, Chapman SK and Munro AW (2000). Probing the NADPH-binding site of *Escherichia coli* flavodoxin oxidoreductase. *Biochem. J.* 352(Pt 2): 257-266.
- Lei L, Waterman MR, Fulco AJ, Kelly SL and Lamb DC (2004). Availability of specific reductases controls the temporal activity of the cytochrome P450 complement of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101(2): 494-499.
- Lill R and Mühlenhoff U (2006). Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 22: 457-486.

- Lipscomb JD, Sligar SG, Namtvedt MJ and Gunsalus IC (1976). Autooxidation and hydroxylation reactions of oxygenated cytochrome P-450cam. *J. Biol. Chem.* 251(4): 1116-1124.
- Lovenberg W, Ed. (1973). Iron-sulphur Proteins, Volume II, Molecular properties. Aus der Serie: Molecular Biology. New York and London, Academic Press.
- Macheroux P (1999). UV-Visible Spectroscopy as a Tool to study Flavoproteins. In: Flavoprotein Protocols. Chapman SK and Reid GA, Eds. Totowa, New Jersey, Humana Press. 131: 1-7.
- Maruya N, Hiwatashi A, Ichikawa Y and Yamano T (1983). Purification and characterization of renal ferredoxin from bovine renal mitochondria. *J. Biochem.* 93(5): 1239-1247.
- Massey V (1994). Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J. Biol. Chem.* 269(36): 22459-22462.
- Massey V (1995). Introduction: flavoprotein structure and mechanism. *Faseb J.* 9(7): 473-475.
- Massey V and Ghisla S (1974). Role of Charge-Transfer Interactions in Flavoprotein Catalysis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 227: 446-465.
- McIver L, Leadbeater C, Campopiano DJ, Baxter RL, Daff SN, Chapman SK and Munro AW (1998). Characterisation of flavodoxin NADP<sup>+</sup> oxidoreductase and flavodoxin; key components of electron transfer in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 257(3): 577-585.
- McLean KJ, Sabri M, Marshall KR, Lawson RJ, Lewis DG, Clift D, Balding PR, Dunford AJ, Warman AJ, McVey JP, Quinn AM, Sutcliffe MJ, Scrutton NS and Munro AW (2005). Biodiversity of cytochrome P450 redox systems. *Biochem. Soc. Trans.* 33(Pt 4): 796-801.
- McLean KJ, Scrutton NS and Munro AW (2003). Kinetic, spectroscopic and thermodynamic characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* adrenodoxin reductase homologue FprA. *Biochem. J.* 372(Pt 2): 317-327.
- McLean KJ, Warman AJ, Seward HE, Marshall KR, Girvan HM, Cheesman MR, Waterman MR and Munro AW (2006). Biophysical characterization of the sterol demethylase P450 from *Mycobacterium tuberculosis*, its cognate ferredoxin, and their interactions. *Biochemistry* 45(27): 8427-8443.
- Meyer J (2000). Clostridial iron-sulphur proteins. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2(1): 9-14.
- Meyer J (2001). Ferredoxins of the third kind. *FEBS Lett.* 509(1): 1-5.
- Meyer J (2008). Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13(2): 157-170.
- Mitou G, Higgins C, Wittung-Stafshede P, Conover RC, Smith AD, Johnson MK, Gaillard J, Stubna A, Munck E and Meyer J (2003). An Isc-type extremely thermostable [2Fe-2S]

- ferredoxin from *Aquifex aeolicus*. Biochemical, spectroscopic, and unfolding studies. *Biochemistry* 42(5): 1354-1364.
- Morales R, Kachalova G, Vellieux F, Charon MH and Frey M (2000). Crystallographic studies of the interaction between the ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase and ferredoxin from the cyanobacterium *Anabaena*: looking for the elusive ferredoxin molecule. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 56(11): 1408-1412.
- Müller JJ, Müller A, Rottmann M, Bernhardt R and Heinemann U (1999). Vertebrate-type and plant-type ferredoxins: crystal structure comparison and electron transfer pathway modelling. *J. Mol. Biol.* 294(2): 501-513.
- Munro AW, Kelly SM and Price NC (1999). Circular Dichroism Studies of Flavoproteins. In: *Flavoprotein Protocols*. Chapman SK and Reid GA, Eds. Totowa, New Jersey, Humana Press. 131: 111-123.
- Murataliev MB (1999). Application of Electron Spin Resonance (ESR) for Detection and Characterization of Flavoprotein Semiquinones. In: *Flavoprotein Protocols*. Chapman SK and Reid GA, Eds. Totowa, New Jersey, Humana Press. 131: 97-110.
- Murataliev MB, Feyereisen R and Walker FA (2004). Electron transfer by diflavin reductases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1698(1): 1-26.
- Mutka SC, Carney JR, Liu Y and Kennedy J (2006). Heterologous production of epothilone C and D in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 45(4): 1321-1330.
- Nagano S, Li H, Shimizu H, Nishida C, Ogura H, Ortiz de Montellano PR and Poulos TL (2003). Crystal structures of epothilone D-bound, epothilone B-bound, and substrate-free forms of cytochrome P450epoK. *J. Biol. Chem.* 278(45): 44886-44893.
- Nakamura S and Kimura T (1971). Studies on spinach ferredoxin-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reductase. Kinetic studies on the interactions of the reductase and ferredoxin and a possible regulation of enzyme activities by ionic strength. *J. Biol. Chem.* 246(20): 6235-6241.
- Nakano T, Hase T and Matsubara H (1981). The complete amino acid sequence of parsley (*Petroselinum sativum*) ferredoxin. *J. Biochem.* 90(6): 1725-1730.
- Naud I, Vincon M, Garin J, Gaillard J, Forest E and Jouanneau Y (1994). Purification of a sixth ferredoxin from *Rhodobacter capsulatus*. Primary structure and biochemical properties. *Eur. J. Biochem.* 222(3): 933-939.
- Newman DJ and Cragg GM (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70(3): 461-477.
- Nomura Y, Nakagawa M, Ogawa N, Harashima S and Oshima Y (1992). Genes in PHT plasmid encoding the initial degradation pathway of phthalate in *Pseudomonas putida*. *J. Ferment. Bioeng.* 74: 333-344.

- Ogura H, Nishida CR, Hoch UR, Perera R, Dawson JH and Ortiz de Montellano PR (2004). EpoK, a cytochrome P450 involved in biosynthesis of the anticancer agents epothilones A and B. Substrate-mediated rescue of a P450 enzyme. *Biochemistry* 43(46): 14712-14721.
- Omura T and Sato R (1964). The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. Ii. Solubilization, Purification, and Properties. *J. Biol. Chem.* 239: 2379-2385.
- Palmer G, Brintzinger H and Estabrook RW (1967). Spectroscopic studies on spinach ferredoxin and adrenodoxin. *Biochemistry* 6(6): 1658-1664.
- Parajuli N, Basnet DB, Chan Lee H, Sohng JK and Liou K (2004). Genome analyses of *Streptomyces peucetius* ATCC 27952 for the identification and comparison of cytochrome P450 complement with other *Streptomyces*. *Arch. Biochem. Biophys.* 425(2): 233-241.
- Pearson WR, Wood T, Zhang Z and Miller W (1997). Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics* 46(1): 24-36.
- Perlova O, Gerth K, Kaiser O, Hans A and Müller R (2006). Identification and analysis of the chivosazol biosynthetic gene cluster from the myxobacterial model strain *Sorangium cellulosum* So ce56. *J. Biotechnol.* 121(2): 174-191.
- Perna NT, Plunkett G, 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Posfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A, Dimalanta ET, Potamiosis KD, Apodaca J, Anantharaman TS, Lin J, Yen G, Schwartz DC, Welch RA and Blattner FR (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature.* 409(6819): 529-533.
- Peterson JA, Lorence MC and Amarneh B (1990). Putidaredoxin reductase and putidaredoxin. Cloning, sequence determination, and heterologous expression of the proteins. *J. Biol. Chem.* 265(11): 6066-6073.
- Podust LM, Kim Y, Arase M, Neely BA, Beck BJ, Bach H, Sherman DH, Lamb DC, Kelly SL and Waterman MR (2003). The 1.92-Å structure of *Streptomyces coelicolor* A3(2) CYP154C1. A new monooxygenase that functionalizes macrolide ring systems. *J. Biol. Chem.* 278(14): 12214-12221.
- Porter TD and Larson JR (1991). Expression of mammalian P450s in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 206: 108-116.
- Pradella S, Hans A, Sproer C, Reichenbach H, Gerth K and Beyer S (2002). Characterisation, genome size and genetic manipulation of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56. *Arch. Microbiol.* 178(6): 484-492.
- Privalov PL (1979). Stability of proteins: small globular proteins. *Adv. Protein Chem.* 33: 167-241.

- Rachid S, Gerth K, Kochems I and Müller R (2007). Deciphering regulatory mechanisms for secondary metabolite production in the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56. *Mol. Microbiol.* 63(6): 1783-1796.
- Ramachandra M, Seetharam R, Emptage MH and Sariaslani FS (1991). Purification and characterization of a soybean flour-inducible ferredoxin reductase of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 173(22): 7106-7112.
- Razquin P, Fillat MF, Schmitz S, Stricker O, Bohme H, Gomez-Moreno C and Peleato ML (1996). Expression of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase in heterocysts from *Anabaena* sp. *Biochem. J.* 316(Pt 1): 157-160.
- Reichenbach H (2001). Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27(3): 149-156.
- Roberts GA, Celik A, Hunter DJ, Ost TW, White JH, Chapman SK, Turner NJ and Flitsch SL (2003). A self-sufficient cytochrome p450 with a primary structural organization that includes a flavin domain and a [2Fe-2S] redox center. *J. Biol. Chem.* 278(49): 48914-48920.
- Roberts GA, Grogan G, Greter A, Flitsch SL and Turner NJ (2002). Identification of a New Class of Cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp. *J. Bacteriol.* 184(14): 3898-3908.
- Ronning CM and Nierman WC (2007). The genomes of *Myxococcus xanthus* and *Stigmatella aurantiaca*. In: *Myxobacteria: Multicellularity and Differentiations*. Whitworth DE, Ed. Washington DC, ASM Press: 285-298.
- Roome PW, Jr., Philley JC and Peterson JA (1983). Purification and properties of putidaredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 258(4): 2593-2598.
- Russel M and Model P (1988). Sequence of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. Relationship to other flavoprotein disulfide oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* 263: 9015-9019.
- Rylott EL, Jackson RG, Edwards J, Womack GL, Seth-Smith HM, Rathbone DA, Strand SE and Bruce NC (2006). An explosive-degrading cytochrome P450 activity and its targeted application for the phytoremediation of RDX. *Nat. Biotechnol.* 24(2): 216-219.
- Sagara Y, Wada A, Takata Y, Waterman MR, Sekimizu K and Horiuchi T (1993). Direct expression of adrenodoxin reductase in *Escherichia coli* and the functional characterization. *Biol. Pharm. Bull.* 16(7): 627-630.
- Sagara Y, Watanabe Y, Kodama H and Aramaki H (1999). cDNA cloning, overproduction and characterization of rat adrenodoxin reductase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1434(2): 284-295.
- Sainz G, Jakoncic J, Sieker LC, Stojanoff V, Sanishvili N, Asso M, Bertrand P, Armengaud J and Jouanneau Y (2006). Structure of a [2Fe-2S] ferredoxin from *Rhodobacter*

- capsulatus* likely involved in Fe-S cluster biogenesis and conformational changes observed upon reduction. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11(2): 235-46. Epub 2006 Jan 10.
- Sambrook J and Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL Press.
- Sawada N, Sakaki T, Yoneda S, Kusudo T, Shinkyo R, Ohta M and Inouye K (2004). Conversion of vitamin D3 to 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 by *Streptomyces griseolus* cytochrome P450SU-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320(1): 156-164.
- Schiffler B and Bernhardt R (2003). Bacterial (CYP101) and mitochondrial P450 systems-how comparable are they? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312(1): 223-228.
- Schiffler B, Bureik M, Reinle W, Müller EC, Hannemann F and Bernhardt R (2004a). The adrenodoxin-like ferredoxin of *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria. *J. Inorg. Biochem.* 98(7): 1229-1237.
- Schiffler B, Zöllner A and Bernhardt R (2004b). Stripping down the mitochondrial cholesterol hydroxylase system, a kinetics study. *J. Biol. Chem.* 279(33): 34269-34276.
- Schmidt CL and Shaw L (2001). A comprehensive phylogenetic analysis of Rieske and Rieske-type iron-sulfur proteins. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33(1): 9-26.
- Schneiker S, Perlova O, Kaiser O, Gerth K, Alici A, Altmeyer MO, Bartels D, Bekel T, Beyer S, Bode E, Bode HB, Bolten CJ, Choudhuri JV, Doss S, Elnakady YA, Frank B, Gaigalat L, Goesmann A, Groeger C, Gross F, Jelsbak L, Kalinowski J, Kegler C, Knauber T, Konietzny S, Kopp M, Krause L, Krug D, Linke B, Mahmud T, Martinez-Arias R, McHardy AC, Merai M, Meyer F, Mormann S, Munoz-Dorado J, Perez J, Pradella S, Rachid S, Raddatz G, Rosenau F, Ruckert C, Sasse F, Scharfe M, Schuster SC, Suen G, Treuner-Lange A, Velicer GJ, Vorholter FJ, Weissman KJ, Welch RD, Wenzel SC, Whitworth DE, Wilhelm S, Wittmann C, Blöcker H, Pühler A and Müller R (2007). Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat. Biotechnol.* 25(11): 1281-1289.
- Seo D, Kamino K, Inoue K and Sakurai H (2004). Purification and characterization of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase encoded by *Bacillus subtilis* yumC. *Arch. Microbiol.* 182(1): 80-89.
- Seo D, Okabe S, Yanase M, Kataoka K and Sakurai T (2008). Studies of interaction of homodimeric ferredoxin-NAD(P)(<sup>+</sup>) oxidoreductases of *Bacillus subtilis* and *Rhodopseudomonas palustris*, that are closely related to thioredoxin reductases in amino acid sequence, with ferredoxins and pyridine nucleotide coenzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 30: 30.
- Serizawa N and Matsuoka T (1991). A two component-type cytochrome P-450 monooxygenase system in a prokaryote that catalyzes hydroxylation of ML-236B to pravastatin, a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1084(1): 35-40.
- Sevrioukova IF and Poulos TL (2002). Putidaredoxin reductase, a new function for an old protein. *J. Biol. Chem.* 277(28): 25831-25839.



- Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y and Ishikawa H (2000). Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature*. 407(6800): 81-86.
- Sielaff B and Andreesen JR (2005a). 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. *Microbiology* 151(Pt 8): 2593-2603.
- Sielaff B and Andreesen JR (2005b). Kinetic and binding studies with purified recombinant proteins ferredoxin reductase, ferredoxin and cytochrome P450 comprising the morpholine mono-oxygenase from *Mycobacterium* sp. strain HE5. *Febs J*. 272(5): 1148-1159.
- Sielaff B, Andreesen JR and Schrader T (2001). A cytochrome P450 and a ferredoxin isolated from *Mycobacterium* sp. strain HE5 after growth on morpholine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56(3-4): 458-464.
- Simunovic V, Zapp J, Rachid S, Krug D, Meiser P and Müller R (2006). Myxovirescin A biosynthesis is directed by hybrid polyketide synthases/nonribosomal peptide synthetase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthases, and trans-acting acyltransferases. *Chembiochem*. 7(8): 1206-1220.
- Sridhar Prasad G, Kresge N, Muhlberg AB, Shaw A, Jung YS, Burgess BK and Stout CD (1998). The crystal structure of NADPH:ferredoxin reductase from *Azotobacter vinelandii*. *Protein Sci*. 7(12): 2541-2549.
- Stephens PJ, Thomson AJ, Dunn JB, Keiderling TA, Rawlings J, Rao KK and Hall DO (1978). Circular dichroism and magnetic circular dichroism of iron-sulfur proteins. *Biochemistry* 17(22): 4770-4778.
- Sticht H and Rosch P (1998). The structure of iron-sulfur proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 70(2): 95-136.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S and Olson MV (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406(6799): 959-964.
- Sugano S, Morishima N, Ikeda H and Horie S (1989). Sensitive assay of cytochrome P450<sub>scc</sub> activity by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 182(2): 327-333.
- Suhara K, Nakayama K, Takikawa O and Katagiri M (1982). Two forms of adrenodoxin reductase from mitochondria of bovine adrenal cortex. *Eur. J. Biochem.* 125(3): 659-664.

- Sykes AG and Cammack R, Eds. (1999). *Advances in Inorganic Chemistry: Iron-Sulfur Proteins*: 47. Aus der., Academic Press Inc.
- Takahashi Y and Nakamura M (1999). Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 126(5): 917-926.
- Takahashi Y and Tokumoto U (2002). A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J. Biol. Chem.* 277(32): 28380-28383.
- Takubo K, Morikawa T, Nonaka Y, Mizutani M, Takenaka S, Takabe K, Takahashi MA and Ohta D (2003). Identification and molecular characterization of mitochondrial ferredoxins and ferredoxin reductase from *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 52(4): 817-830.
- Tanaka M, Haniu M and Yasunobu KT (1976). The complete amino acid sequence of the *Spirulina platensis* ferredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69(3): 759-765.
- Tang L, Shah S, Chung L, Carney J, Katz L, Khosla C and Julien B (2000). Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science* 287(5453): 640-642.
- Tejero J, Peregrina JR, Martinez-Julvez M, Gutierrez A, Gomez-Moreno C, Scrutton NS and Medina M (2007). Catalytic mechanism of hydride transfer between NADP<sup>+</sup>/H and ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase from *Anabaena* PCC 7119. *Arch. Biochem. Biophys.* 459(1): 79-90.
- Thomas JG and Baneyx F (1997). Divergent effects of chaperone overexpression and ethanol supplementation on inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli*. *Protein. Expr. Purif.* 11(3): 289-296.
- Thomas SH, Wagner RD, Arakaki AK, Skolnick J, Kirby JR, Shimkets LJ, Sanford RA and Loffler FE (2008). The mosaic genome of *Anaeromyxobacter dehalogenans* strain 2CP-C suggests an aerobic common ancestor to the delta-proteobacteria. *PLoS One* 3(5): e2103.
- Trower MK, Emptage MH and Sariaslani FS (1990a). Purification and characterization of a 7Fe ferredoxin from *Streptomyces griseus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1037(3): 281-289.
- Trower MK, Lenstra R, Omer C, Buchholz SE and Sariaslani FS (1992). Cloning, nucleotide sequence determination and expression of the genes encoding cytochrome P-450soy (soyC) and ferredoxinsoy (soyB) from *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* 6(15): 2125-2134.
- Trower MK, Marshall JE, Doleman MS, Emptage MH and Sariaslani FS (1990b). Primary structure of a 7Fe ferredoxin from *Streptomyces griseus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1037(3): 290-296.
- Tyson CA, Lipscomb JD and Gunsalus IC (1972). The role of putidaredoxin and P450 cam in methylene hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 247(18): 5777-5784.

- Uchiumi T, Ohwada T, Itakura M, Mitsui H, Nukui N, Dawadi P, Kaneko T, Tabata S, Yokoyama T, Tejima K, Saeki K, Omori H, Hayashi M, Maekawa T, Sriprang R, Murooka Y, Tajima S, Simomura K, Nomura M, Suzuki A, Shimoda Y, Sioya K, Abe M and Minamisawa K (2004). Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. *J. Bacteriol.* 186(8): 2439-2448.
- Uhlmann H and Bernhardt R (1995). The role of threonine 54 in adrenodoxin for the properties of its iron-sulfur cluster and its electron transfer function. *J. Biol. Chem.* 270(50): 29959-29966.
- Uhlmann H, Iametti S, Vecchio G, Bonomi F and Bernhardt R (1997). Pro108 is important for folding and stabilization of adrenal ferredoxin, but does not influence the functional properties of the protein. *Eur. J. Biochem.* 248(3): 897-902.
- Usanov SA, Graham SE, Lepesheva GI, Azeva TN, Strushkevich NV, Gilep AA, Estabrook RW and Peterson JA (2002). Probing the interaction of bovine cytochrome P450<sub>sc</sub> (CYP11A1) with adrenodoxin: evaluating site-directed mutations by molecular modeling. *Biochemistry.* 41(26): 8310-8320.
- Vahdat L (2008). Ixabepilone: a novel antineoplastic agent with low susceptibility to multiple tumor resistance mechanisms. *Oncologist.* 13(3): 214-221.
- Wang SP, Chen YP and Ely B (1995). A ferredoxin, designated FdxP, stimulates p-hydroxybenzoate hydroxylase activity in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 177(10): 2908-2911.
- Weissman KJ and Müller R (2009). A brief tour of myxobacterial secondary metabolism. *Bioorg. Med. Chem.* 17(6): 2121-2136.
- Wenzel SC and Müller R (2009a). The biosynthetic potential of myxobacteria and their impact in drug discovery. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 12(2): 220-230.
- Wenzel SC and Müller R (2009b). Myxobacteria - 'microbial factories' for the production of bioactive secondary metabolites. *Mol. Biosyst.* 5(6): 567-574.
- Werck-Reichhart D and Feyereisen R (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* 1(6): REVIEWS3003.
- Zhao B, Lin X, Lei L, Lamb DC, Kelly SL, Waterman MR and Cane DE (2008). Biosynthesis of the sesquiterpene antibiotic albaflavenone in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Biol. Chem.* 283(13): 8183-8189.
- Zheng L, Cash VL, Flint DH and Dean DR (1998). Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 273(21): 13264-13272.
- Ziegler GA, Vonrhein C, Hanukoglu I and Schulz GE (1999). The structure of adrenodoxin reductase of mitochondrial P450 systems: electron transfer for steroid biosynthesis. *J. Mol. Biol.* 289(4): 981-990.

## 6. Anhang

### 6.1. Ergebnisse der Blast Suche

**Tabelle 6.1: Blast Suche**

Mit den unter UniProt Eintrag aufgeführten Sequenzen wurde eine „Blast“ Suche des *S. celluloseum* So ce56 Genoms durchgeführt. Hier aufgeführt und weiter bearbeitet wurden nur Hits mit einem e-Wert von  $< 1e^{-03}$ . Die mit „\*“ markierten Treffer wurden nach manueller Ansicht von weiteren Untersuchungen ausgenommen.

UniProt Eintrag	Organismus	Beschreibung	Hit	Bit score	e-Wert	So ce56 Protein
<b>Ferredoxine</b>						
P10109	<i>Homo sapiens</i>	[2Fe-2S]	sce7334	43.9	2e-05	Fdx1
P00257	<i>Bos taurus</i>	[2Fe-2S]	sce7334	43.5	2e-05	Fdx1
P00259	<i>Pseudomonas putida</i>	[2Fe-2S]	sce7334	44.3	5e-06	Fdx1
P0A9R5	<i>Escherichia coli</i>	[2Fe-2S]	sce7334 sce1842	67.8 37.7	4e-13 4e-04	Fdx1 *
P07324	<i>Clostridium pasteurianum</i>	[2Fe-2S]	sce0245 sce9225	64.7 63.2	3e-12 1e-11	* Fdx3
P82802	<i>Azotobacter vinelandii</i>	[2Fe-2S]	sce9225 sce0245	57.8 50.1	4e-10 9e-08	Fdx3 *
O69222	<i>Azotobacter vinelandii</i>	[2Fe-2S]	sce7334	54.3	5e-09	Fdx1
Q51383	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	[2Fe-2S]	sce7334 sce7304	63.2 37.0	9e-12 8e-04	Fdx1 Fdx5
P80306	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	[2Fe-2S]	sce7334	66.6	8e-13	Fdx1
P37098	<i>Caulobacter crescentus</i>	[2Fe-2S]	-	-	-	-
Q98M05	<i>Mesorhizobium loti</i>	[2Fe-2S]	sce7334	47.4	5e-07	Fdx1
P57661	<i>Buchnera aphidicola</i>	[2Fe-2S]	sce7334 sce1842	73.6 44.3	6e-15 5e-06	Fdx1 *
P00221	<i>Spinacia oleracea</i>	[2Fe-2S]	-	-	-	-
Q7M1S1	<i>Petroselinum crispum</i>	[2Fe-2S]	-	-	-	-
O80429	<i>Zea mays</i>	[2Fe-2S]	-	-	-	-
P0A3C8	<i>Anabaena</i> (strain PCC7119)	[2Fe-2S]	sce1842	36.6	9e-04	*
P00246	<i>Spirulina platensis</i>	[2Fe-2S]	-	-	-	-
Q5RLM5	<i>Mycobacterium</i> sp. HE5	[3Fe-4S]	-	-	-	-
Q7AKQ2	<i>Streptomyces coelicolor</i>	[3Fe-4S]	-	-	-	-
P26910	<i>Streptomyces griseus</i>	[3Fe-4S]	-	-	-	-
P50727	<i>Bacillus subtilis</i>	[4Fe-4S]	-	-	-	-
P00198	<i>Clostridium acidi-urici</i>	[4Fe-4S]	sce8005	56.6	8e-10	Fdx2
A7H9A2	<i>Anaeromyxobacter</i> sp. (strain Fw109-5)	[4Fe-4S]	sce8005	56.6	8e-10	Fdx2
Q3M338	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	[4Fe-4S]	sce3039	141	2e-35	Fdx4
Q9WWU2	<i>Pseudomonas putida</i>	[4Fe-4S]	sce3039	138	2e-34	Fdx4
Q0JXF0	<i>Variovorax</i> sp. SB1	[4Fe-4S]	sce3039 sce2755	124 38.5	4e-30 2e-04	Fdx4 Fdx7
B0UJZ5	<i>Methylobacterium</i> sp. (strain 4-46)	[4Fe-4S]	sce5732 sce4434	47.8 46.2	5e-06 1e-05	Fdx6 *
B2J8H3	<i>Nostoc punctiforme</i> (strain	[4Fe-4S]	sce2755	95.9	1e-21	Fdx 7

	ATCC 29133 / PCC 73102)		sce3039 sce4344	41.2 39.3	3e-05 1e-04	Fdx4 *
P64122	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	[3Fe-4S], [4Fe-4S]	sce5549	60.8	6e-11	Fdx8
P13279	<i>Streptomyces griseus</i>	[3Fe-4S], [4Fe-4S]	sce5549	81.6	2e-17	Fdx8
Q9FC76	<i>Streptomyces coelicolor</i>	[3Fe-4S], [4Fe-4S]	sce5549	82.4	1e-17	Fdx8
Q9F335	<i>Streptomyces coelicolor</i>	[3Fe-4S], [4Fe-4S]	sce5549	82.4	1e-17	Fdx8
Q9EWQ1	<i>Streptomyces coelicolor</i>	[3Fe-4S], [4Fe-4S]	-	-	-	-
Q9EWS5	<i>Streptomyces coelicolor</i>	[3Fe-4S], [4Fe-4S]	-	-	-	-
Q9KXY1	<i>Streptomyces coelicolor</i>	[3Fe-4S], [4Fe-4S]	-	-	-	-
<b>Flavoproteine</b>						
Q9Z615	<i>Buchnera aphidicola</i>	Ferredoxin Reduktase	sce7188 sce5135	109 60,8	5e-25 2e-10	FdRA FdRB
P28861	<i>Escherichia coli</i> K12	Ferredoxin Reduktase	sce7188 sce5135 sce1842	135 67,4 53,1	7e-33 2e-12 5e-08	FdRA FdRB *
P08165	<i>Bos taurus</i>	Ferredoxin Reduktase	sce5061 sce6398	59,3 48,5	2e-09 3e-06	* *
O05783	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Ferredoxin Reduktase	sce6398 sce5061	57,4 43,9	5e-09 6e-05	* *
Q44532	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Ferredoxin Reduktase	sce7188 sce5135	305 46.6	6e-84 5e-06	FdRA FdRB
P10933	<i>Pisum sativum</i>	Ferredoxin Reduktase	sce5135	67.0	5e-12	FdRB
P21890	<i>Anabaena</i> sp. (strain PCC 7119)	Ferredoxin Reduktase	sce5135	80.9	4e-16	FdRB
P00455	<i>Spinacia oleracea</i>	Ferredoxin Reduktase	sce5135	66.2	9e-12	FdRB
Q3SYT8	<i>Bos taurus</i>	Cytochrome P450 Reduktase	sce5135	44.3	9e-05	FdRB
Q00141	<i>Aspergillus niger</i>	Cytochrome P450 Reduktase	-	-	-	-
P33164	<i>Burkholderia cepacia</i>	Phthalat- Dioxygenase Reduktase	sce5135 sce0245 sce1582	50,8 43,5 41,6	3e-07 5e-05 2e-04	FdRB * *
P61949	<i>Escherichia coli</i>	Flavodoxin	-	-	-	-
O34737	<i>Bacillus subtilis</i>	Flavodoxin	-	-	-	-
O34589	<i>Bacillus subtilis</i>	Flavodoxin	-	-	-	-
Q8VQF4	<i>Citrobacter braakii</i>	Flavodoxin	-	-	-	-





		einer <i>Nco</i> I Schnittstelle
FdR1_Hind_Eco	GCATGAATTCAAGCTTCACGCCGGCCGGACAGGTTCG	So ce56 Gen sce7188, Primer rückwärts, Einfügen einer <i>Eco</i> RI und einer <i>Hind</i> III Schnittstelle
FdR1_his_Hind_Eco	GCATGAATTCAAGCTTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCGCCGGCCGGACAGGTTCG	So ce56 Gen sce7188, Primer rückwärts, Einfügen eines <i>His</i> <sub>6</sub> -tags sowie einer <i>Eco</i> RI und einer <i>Hind</i> III Schnittstelle
FdR3_Nco	CAGTCCATGGTCCAAGCCGAACCGTTCGAAGCC	So ce56 Gen sce5135, Primer vorwärts, Einfügen einer <i>Nco</i> I Schnittstelle
FdR3_Eco_Hind	GCATAAGCTTGAATTCAGTCGTAGCGCTCGACGTGG	So ce56 Gen sce5135, Primer rückwärts, Einfügen einer <i>Eco</i> RI und einer <i>Hind</i> III Schnittstelle
FdR3_rev_his	GCATAAGCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCGTAGCGCTCGACGTGG	So ce56 Gen sce5135, Primer rückwärts, Einfügen eines <i>His</i> <sub>6</sub> -tags sowie einer <i>Hind</i> III Schnittstelle



### 6.3. Verwendete Plasmide

**Tabelle 6.3: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Klonierungs- und Expressionsplasmide**

Mit einem Stern sind die Plasmide gekennzeichnet, die erfolgreich für die Expression der Proteine benutzt wurden. Die Nummer gibt die Position der Plasmide in der Plasmidsammlung der Arbeitsgruppe Bernhardt an.

Plasmidvektor	Insert	Bemerkung	Nr.
pCR4Blunt	Fdx1	Insert entspricht sequenziertem pGEX6P1_nco	8.77
pCR4Blunt	Fdx2	Insert entspricht sequenziertem pGEX6P1_nco	8.78
pCR4Blunt	Fdx3	Insert entspricht sequenziertem pGEX6P1_nco	8.93
pCR4Blunt	Fdx4	Insert entspricht sequenziertem pGEX6P1_nco	8.79
pCR4Blunt	Fdx5	Insert entspricht sequenziertem pGEX6P1_nco	9.00
pCR4Blunt	Fdx6	sequenziert MWG 24.05.2006	9.05
pCR4Blunt	Fdx7	sequenziert MWG 21.11.2006	10.02
pCR4Blunt	Fdx8	sequenziert MWG 07.12.2006	10.04
pCR4Blunt	FdR A	Insert entspricht sequenziertem pGEX6P1_nco	8.80
pCR4Blunt	FdR B	sequenziert MWG 08.06.2006	9.11
pCR4Blunt	Fdx1his	sequenziert MWG 04.11.2005	8.85
pCR4Blunt	Fdx2his	sequenziert MWG 04.11.2005	8.86
pCR4Blunt	Fdx3his	sequenziert MWG 08.06.2006	8.96
pCR4Blunt	Fdx4his	sequenziert MWG 20.06.2006	8.98
pCR4Blunt	Fdx5his	sequenziert MWG 08.06.2006/ MWG 24.05.2006	9.03
pCR4Blunt	Fdx6his	sequenziert MWG 24.05.2006	9.08
pCR4Blunt	Fdx7his	sequenziert MWG 21.11.2006	10.03
pCR4Blunt	Fdx8his	sequenziert MWG 07.12.2006	10.05
pCR4Blunt	FdR A his	sequenziert MWG 21.07.2005	8.82
pCR4Blunt	FdR B his	sequenziert MWG 08.06.2006	9.14
pGEX6P1_nco*	Fdx1	sequenziert MWG 15.02.2005	8.63
pGEX6P1_nco	Fdx2	sequenziert MWG 15.02.2005	8.64
pGEX6P1_nco	Fdx3	sequenziert MWG 17.01.2006	8.95
pGEX6P1_nco	Fdx4	sequenziert MWG 15.02.2005	8.65
pGEX6P1_nco	Fdx5	sequenziert MWG 17.01.2006	9.02
pGEX6P1_nco	Fdx6	sequenziert MWG 24.05.2006	9.07
pGEX6P1_nco	Fdx7	sequenziert MWG 21.11.2006	10.15
pGEX6P1_nco	Fdx8	sequenziert MWG 27.12.2006	10.16
pGEX6P1_nco	FdR A	sequenziert MWG 28.02.2005	8.66
pGEX6P1_nco*	FdR B	sequenziert MWG 20.06.2006	9.13
pKKHC	Fdx1	Insert entspricht sequenziertem pGEX6P1_nco	8.70
pKKHC	Fdx2	Insert entspricht sequenziertem pGEX6P1_nco sequenziert MWG 13.02.2009	8.71
pKKHC	Fdx3	Insert entspricht sequenziertem pGEX6P1_nco	8.94
pKKHC	Fdx4	sequenziert MWG 23.01.2009/MWG 28.01.2009	8.72
pKKHC	Fdx5	Insert entspricht sequenziertem pGEX6P1_nco	9.01
pKKHC	Fdx6	Insert entspricht sequenziertem pGEX6P1_nco	9.06

pKKHC	Fdx7	Insert entspricht sequenziertem pGEX6P1_nco	10.09
pKKHC	Fdx8	Insert entspricht sequenziertem pGEX6P1_nco	10.11
pKKHC*	FdR A	Insert entspricht sequenziertem pGEX6P1_nco	8.73
pKKHC*	FdR B	Insert entspricht sequenziertem pGEX6P1_nco	9.12
pKKHC	Fdx1his	Insert entspricht sequenziertem pCR4Blunt	8.87
pKKHC*	Fdx2his	sequenziert MWG 13.02.2009	8.88
pKKHC*	Fdx3his	Insert entspricht sequenziertem pCR4Blunt	8.97
pKKHC	Fdx4his	sequenziert MWG 06.02.2009/MWG 27.02.2009	9.80
pKKHC*	Fdx5his	Insert entspricht sequenziertem pCR4Blunt	9.04
pKKHC*	Fdx6his	Insert entspricht sequenziertem pCR4Blunt	9.09
pKKHC	Fdx7his	Insert entspricht sequenziertem pCR4Blunt	10.10
pKKHC*	Fdx8his	sequenziert MWG 20.02.2009	10.12
pKKHC*	FdR A his	Insert entspricht sequenziertem pCR4Blunt	8.83
pKKHC*	FdR B his	Insert entspricht sequenziertem pCR4Blunt	9.15

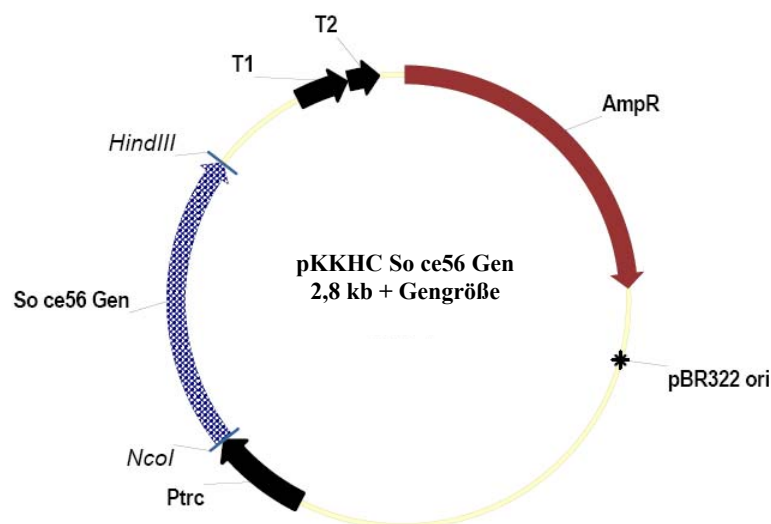


Abbildung 6.3.1: Karte des Expressionsplasmids pKKHC



#### 6.4. Abgeleitete Aminosäuresequenzen der Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen aus *Sorangium cellulosum* So ce56

Dargestellt ist jeweils die in der Datenbank hinterlegte Proteinsequenz (UniProt Nummer) im Vergleich zu der Sequenz, die von dem mit den in Abschnitt 6.2. aufgeführten Primern hergestellten PCR Produkt abgeleitet wurde. Aufgeführt werden nur die Formen, die im Rahmen dieser Arbeit exprimiert werden konnten (Fdx2, Fdx3, Fdx5, Fdx6, Fdx8 sowie FdRA und FdRB: mit *His<sub>6</sub>-tag*, Fdx1 und Fdx7 nach Abspaltung des *GST-tags*). Nach Abspaltung des *GST-tags* verbleiben N-terminal zwei zusätzliche Aminosäuren (G, P) am heterolog exprimierten Protein. Der Sequenzunterschied im N-terminalen Bereich von Fdx6 ist darauf zurückzuführen, dass zu dem Zeitpunkt, als das Gen kloniert wurde, von einem anderen Startpunkt des sce5732 ausgegangen wurde. Da das Protein aber auch mit der verkürzten Sequenz einen für Ferredoxine relativ hohen theoretischen pI (6,29) sowie ein hohes Molekulargewicht (24,4 kD) aufweist, wurde auf eine erneute Klonierung und Expression verzichtet.

##### Fdx1

A9EY18 1 --MAKVRFLAHGRAWEVEAPVGSSVLQASKSVGAPEGDACGGVCACSTCHVYVTKGRELL  
Fdx1 1 **GP**MAKVRFLAHGRAWEVEAPVGSSVLQASKSVGAPEGDACGGVCACSTCHVYVTKGRELL

A9EY18 59 SEAEDEEDILDKAFDVRSTSRILGCQARILKDGDI EAEISRESLDAFYNEHPNVKDPRKG  
Fdx1 61 SEAEDEEDILDKAFDVRSTSRILGCQARILKDGDI EAEISRESLDAFYNEHPNVKDPRKG

##### Fdx2

A9FH21 1 MATYITEDCINCGACEPECPNEAISEGDEIYVIDPELCTECVGFYDHEACQAVCPVECCL  
Fdx2 1 MATYITEDCINCGACEPECPNEAISEGDEIYVIDPELCTECVGFYDHEACQAVCPVECCL

A9FH21 61 PNPQIVETEEVLIARAVRLHPDDGELKKRAAANDYPSRFRK-----  
Fdx2 61 PNPQIVETEEVLIARAVRLHPDDGELKKRAAANDYPSRFRK**HHHHH**

##### Fdx3

A9GDT7 1 -MPQRKRYLFVCVNRDPDGVPKGSCAQRGAEIHVQLKAALAERGLAKVEARACSASCLD  
Fdx3 1 **MV**PQRKRYLFVCVNRDPDGVPKGSCAQRGAEIHVQLKAALAERGLAKVEARACSASCLD

A9GDT7 60 VCWAGPVI AVEPDGYFYGRVTPADVPEIVDALASGRRVERLVLPPEDFTEATAAPPLPAP  
Fdx3 61 VCWAGPVI AVEPDGYFYGRVTPADVPEIVDALASGRRVERLVLPPEDFTEATAAPPLPAP

A9GDT7 120 PRGAPPQA-----  
Fdx3 121 PRGAPPQA**HHHHHH**

**Fdx5**

A9EXQ0 1 -MPTVVFEDGALGPAVTAEAGAGRLIDVCDDARAPIVFSCRDARCATCRVEVVEGEQLLE  
 Fdx5 1 **MV**PPTVVFEDGALGPAVTAEAGAGRLIDVCDDARAPIVFSCRDARCATCRVEVVEGEQLLE

A9EXQ0 60 PPARGERDLLERLGAPPRLRLACQAVLRAGPGLIRLRGVVVGREG-----  
 Fdx5 61 PPARGERDLLERLGAPPRLRLACQAVLRAGPGLIRLRGVVVGREG**HHHHHH**

**Fdx6**

A9G7R4 1 -----MPI SWLDLSSRCERAGLPLRGGFHPREGDGVPAAGDLPAGTLVLLGNA  
 Fdx6 1 **MARGSGRPKRAA**MPI SWLDLSSRCERAGLPLRGGFHPREGDGVPAAGDLPAGTLVLLGNA

A9G7R4 49 GPSMWRAF SRARKDAPDLALDDWTVAVV SPLAAELGATALFPFTGPPYWPFQRWAQQVEA  
 Fdx6 61 GPSMWRAF SRARKDAPDLALDDWTVAVV SPLAAELGATALFPFTGPPYWPFQRWAQQVEA

A9G7R4 109 LSPSPLAILIHPRFGLWHGYRAALVFAERLSLPPREDLASPCISCAGQPCLSACPVSASF  
 Fdx6 121 LSPSPLAILIHPRFGLWHGYRAALVFAERLSLPPREDLASPCISCAGQPCLSACPVSASF

A9G7R4 169 PGSYDVAACVGHLDAGPGATCMTGGCLSRRACPIGQEHYYPDEQREFHMR AFLRAMSITG  
 Fdx6 181 PGSYDVAACVGHLDAGPGATCMTGGCLSRRACPIGQEHYYPDEQREFHMR AFLRAMSITG

A9G7R4 229 G-----  
 Fdx6 241 **GHHHHHH**

**Fdx7**

A9GAV0 1 --MGHLLNRESVKAQSAR SVGHAEAAVRLDLPVVIDEASCIKGCRICIDSCPVDCLAIDP  
 Fdx7 1 **GP**MGHLLNRESVKAQSAR SVGHAEAAVRLDLPVVIDEASCIKGCRICIDSCPVDCLAIDP

A9GAV0 59 ETKKARMAYDECWYCLACEIDCPKEAITVKIPFLIR  
 Fdx7 61 ETKKARMAYDECWYCLACEIDCPKEAITVKIPFLIR

**Fdx8**

A9G317 1 MAYVIAEPCVATCDTACVPVCPVDCIHGPLAADEISR IPEGERKTRLAGLQLYIDPESCI  
 Fdx8 1 MAYVIAEPCVATCDTACVPVCPVDCIHGPLAADEISR IPEGERKTRLAGLQLYIDPESCI

A9G317 61 CCGACENECVGAIFDEDELPAEWQRYREINARFFDDRAKERAPEET-----  
 Fdx8 61 CCGACENECVGAIFDEDELPAEWQRYREINARFFDDRAKERAPEET**HHHHHH**

**FdRA**

A9ES55 1 M V P G Y T E E T V L E V H H W T D K L F T L K T T R S P S F R F A N G Q F C M M G L V V A G K P L V R A Y S L A S A N  
 FdRA 1 M V P G Y T E E T V L E V H H W T D K L F T L K T T R S P S F R F A N G Q F C M M G L V V A G K P L V R A Y S L A S A N

A9ES55 61 H E E T L E F F S I K V P N G P L T S R L Q H I A V G E T I L V G K R A T G T L T I G N L R P G R T L W L L A T G T G L  
 FdRA 61 H E E T L E F F S I K V P N G P L T S R L Q H I A V G E T I L V G K R A T G T L T I G N L R P G R T L W L L A T G T G L

A9ES55 121 A P F L S V V K D P E T Y E R F E R V V I T H T C R R V Q D L A Y A R Y L E H E L A A D E L L G E I V R P K L R Y Y P S  
 FdRA 121 A P F L S V V K D P E T Y E R F E R V V I T H T C R R V Q D L A Y A R Y L E H E L A A D E L L G E I V R P K L R Y Y P S

A9ES55 181 V T R E A F K T E G R I T A L L E S G R I F A D L A L P A L D P A H D R L M L C G S S E M L A D T A A L L E A R G F E E  
 FdRA 181 V T R E A F K T E G R I T A L L E S G R I F A D L A L P A L D P A H D R L M L C G S S E M L A D T A A L L E A R G F E E

A9ES55 241 G N S G E P G D Y L V E K A F A G E K R S P L A S A S P A E S T N L S G P A - - - - -  
 FdRA 241 G N S G E P G D Y L V E K A F A G E K R S P L A S A S P A E S T N L S G P A **HHHHH**

**FdRB**

A9FRJ0 1 M I Q A E P F E A R L V A V R P L S P F V R E L S F E R A D G K A F L F E A G Q W V N L V L P L P G G E V K R A Y S I A  
 FdRB 1 M V Q A E P F E A R L V A V R P L S P F V R E L S F E R A D G K A F L F E A G Q W V N L V L P L P G G E V K R A Y S I A

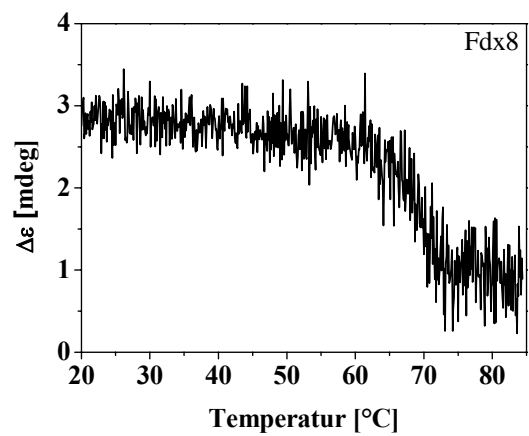
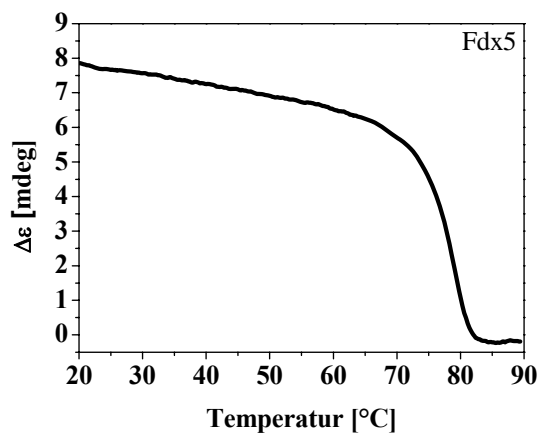
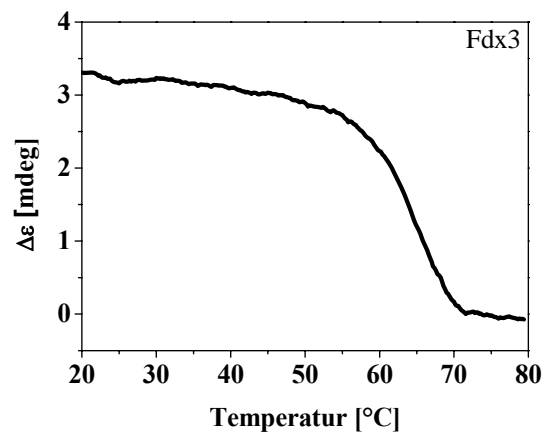
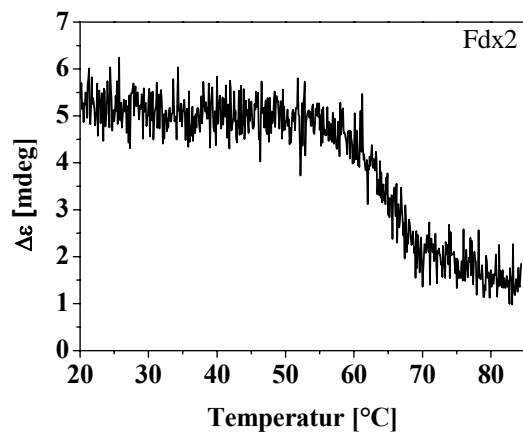
A9FRJ0 61 S A P D G S P R F D L A V T R V E G G A G S E Y L H R L E P G A T L R A V G P H G L F T R D P G S P A S L F V A T G T  
 FdRB 61 S A P D G S P R F D L A V T R V E G G A G S E Y L H R L E P G A T L R A V G P H G L F T R D P G S P A S L F V A T G T

A9FRJ0 121 G V T P L R S M L R A S L R A G A A A H L W I L F G A R F E E D I I Y R D E L E A L A R G S D R I R Y E I T L S R G G P  
 FdRB 121 G V T P L R S M L R A S L R A G A A A H L W I L F G A R F E E D I I Y R D E L E A L A R G S D R I R Y E I T L S R G G P

A9FRJ0 181 S W S G R R G Y V Q A H V P E L Y R E L A G A S G D P A P H V F I C G L D R M V S L V R E L A R G E L G V P R K H V H V  
 FdRB 181 S W S G R R G Y V Q A H V P E L Y R E L A G A S G D P A P H V F I C G L D R M V S L V R E L A R G E L G V P R K H V H V

A9FRJ0 241 E R Y D - - - - -  
 FdRB 241 E R Y D **HHHHH**

### 6.5. Schmelzkurven der *S. cellulorum* So ce56 Ferredoxine und Ferredoxin Reduktasen



## 6.6. Veröffentlichungen

Hannemann F, Bichet A, Ewen KM, Bernhardt R

**Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains.**

Biochim. Biophys. Acta. 2007 Mar;1770(3):330-44.

Ewen KM, Schiffler B, Uhlmann-Schiffler H, Bernhardt R, Hannemann F

**The endogenous adrenodoxin reductase-like flavoprotein arh1 supports heterologous cytochrome p450-dependent substrate conversions in *Schizosaccharomyces pombe*.**

FEMS Yeast Res. 2008 May;8(3):432-41.

Ewen KM, Hannemann F, Khatri Y, Perlova O, Kappl R, Krug D, Hüttermann J, Müller R, Bernhardt R

**Genome mining in *Sorangium cellulosum* So ce56 - identification and characterization of the homologous electron transfer proteins of a myxobacterial cytochrome P450**

J Biol.Chem. 2009, in press

Khatri Y, Hannemann F, Ewen KM, Perlova O, Brachmann AO, Müller R, Bernhardt R

**The cytochrome P450 complement (CYPome) of *Sorangium cellulosum* So ce56 and identification of CYP109D1 as a new fatty acid hydroxylase**

Manuscript in preparation

Ewen KM, Hannemann F, Bernhardt R

**A Ferredoxin from *Sorangium cellulosum* So ce56 supports mammalian CYP11A1 – Evidence for an evolutionary relationship of Adx and isc-type Ferredoxins**

Manuscript in preparation



**Posterpräsentationen auf internationalen Kongressen:**

Kerstin M. Ewen, Frank Hannemann, Olena Perlova, Rolf Müller, Rita Bernhardt

**Putative members of the P450 electron transport chain in *Sorangium cellulosum***

8<sup>th</sup> International Symposium on “Cytochromes P450 Biodiversity and Biotechnology”  
Swansea, Wales, UK, 23.07.2006 - 27.07.2006

Kerstin M. Ewen, Burkhard Schiffler, Heike Uhlmann-Schiffler, Rita Bernhardt, Frank Hannemann

**Stabilization of the adrenodoxin reductase homologue from *Schizosaccharomyces pombe* by site-directed mutagenesis**

5<sup>th</sup> Status Symposium “Interplay between Molecular Conformations and Biological Function”  
Bad Kissingen, Germany, 06.10.2006 - 08.10.2008