

Formiat-Stoffwechsel in *Eubacterium acidaminophilum*:

**Molekulare und biochemische Charakterisierung der
Wolfram- und Selen-haltigen Formiat-Dehydrogenasen
sowie einer Eisen-Hydrogenase**



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Andrea Gräntzdörffer
geb. am 27.04.1973 in Lüneburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. J. R. Andreesen
2. Prof. Dr. B. Bowien
3. PD Dr. habil. J. Heider

Verteidigung: 14. Dezember 2000, Halle (Saale)

LA SCIENCE EST UN JEU
DONT LA RÈGLE DU JEU
CONSISTE À CHERCHER LA RÈGLE DU JEU.

FRANÇOIS CAVANNA

DEM GEDENKEN MEINES GROßVATERS GEWIDMET

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	IV
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	7
2.1 Verwendete Organismen und mikrobiologische Methoden	7
2.2 Molekularbiologische Methoden	14
2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren und Restriktion von DNA	14
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	15
2.2.3 Transformation	16
2.2.4 Übertragung von DNA durch Konjugation	17
2.2.5 Herstellung einer Genbank von genomischer <i>E. acidaminophilum</i> -DNA	18
2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	18
2.2.7 Hybridisierung	20
2.2.8 DNA-Sequenzierung	22
2.2.9 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch „primer extension“	23
2.2.10 RT-PCR	23
2.2.11 Einführung einer Punktmutation mittels <i>overlap-extension</i> -PCR	24
2.3 Allgemeine biochemische Methoden	24
2.3.1 Entsalzen und Einengen von Proteinsuspensionen	24
2.4 Methoden zur Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase	25
2.4.1 Bestimmung der Formiat-Dehydrogenase-Aktivität	25
2.4.2 Voraussetzungen für die Anreicherung sauerstoff-empfindlicher Proteine	27
2.4.3 Puffer für die Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase	27
2.4.4 Fällungen	28
2.4.5 Säulenchromatographie	28
2.5 Methoden zur Anreicherung der Restriktionsendonuklease <i>EacI</i>	30
2.5.1 Restriktionsendonuklease-Assay nach SCHLEIF (1980)	30
2.5.2 Bestimmung der <i>EacI</i> -Aktivität	30
2.5.3 Puffer für die Anreicherung von <i>EacI</i>	31
2.5.4 Anreicherung von <i>EacI</i>	31
2.6 Anreicherung des Surface-Layer-Proteins	32
2.7 Überexpression von Proteinen	33
2.7.1 Herstellung rekombinanter Proteine mit dem IMPACT [®] -System	33
2.7.2 Herstellung rekombinanter Proteine mit dem <i>Strep-tag</i> [®] -System	34
2.8 Analytische Methoden	35
2.8.1 Proteinbestimmung durch Färbung mit Coomassie Blue	35

2.8.2	Protein-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen	35
2.8.3	Transfer von Proteinen mittels Western-Blot	36
2.8.4	Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz	37
2.8.5	Bestimmung von W, Mo, Fe und Se	37
2.8.6	Nachweis des Pterin-Cofaktors	38
2.8.7	Nachweis der Schnittstelle von <i>EacI</i>	38
2.9	Materialien, Chemikalien und Enzyme	39
3	Experimente und Ergebnisse	40
3.1	Molekulare Analyse der Formiat-Dehydrogenase aus <i>E. acidaminophilum</i>	40
3.1.1	Klonierung und Sequenzierung der <i>fdh</i> -Gene	40
3.1.2	Analyse der <i>fdh</i> -Gensätze	42
3.1.3	Sequenzanalyse der Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenasen aus <i>E. acidaminophilum</i>	43
3.1.4	Klonierung einer Eisen-Hydrogenase	45
3.1.5	Analyse der Hydrogenase-Genregion	46
3.1.6	Charakterisierung der klonierten Bereiche und seiner Genprodukte	49
3.1.7	Codonnutzung in den sequenzierten Genen von <i>E. acidaminophilum</i>	49
3.1.8	Untersuchungen zur Transkription	51
3.1.9	RT-PCR zur Quantifizierung der Transkription der verschiedenen Gensätze	55
3.2	Molekulare Analyse der Formiat-Dehydrogenase von <i>C. sticklandii</i>	56
3.2.1	Identifizierung der Formiat-Dehydrogenase und AOR/CAR von <i>C. sticklandii</i>	56
3.3	Überexpression von FdhA1 in <i>E. coli</i>	59
3.3.1	Expression von FdhB1 und FdhA1 mit dem IMPACT-System	60
3.3.2	Expression von FdhA1 als <i>Strep-tagII</i> -Fusion	61
3.4	Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase aus <i>E. acidaminophilum</i>	63
3.4.1	Vorversuche zur Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase	64
3.4.2	1. Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase	65
3.4.3	Gelfiltration an Superdex 200	66
3.4.4	N-terminale Sequenzierungen	68
3.4.5	Aufnahme eines UV-VIS-Spektrums (1)	69
3.4.6	Elementanalyse durch Neutronenaktivierung	70
3.4.7	2. Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase	70
3.4.8	N-terminale Sequenzierungen (2)	72
3.4.9	Aufnahme eines UV-VIS-Spektrums (2)	73
3.4.10	Identifizierung eines Pterin-Cofaktors	74
3.4.11	Versuche zur CO ₂ -Reduktion	75
3.4.12	Identifizierung der Pyruvat-Oxidoreduktase	76
3.5	Nachweis einer Pyruvat-Formiat-Lyase im Genom von <i>E. acidaminophilum</i>	76

3.6	Aufbau eines Transformationssystems für <i>E. acidaminophilum</i>	78
3.6.1	Kultivierung von <i>E. acidaminophilum</i> auf festen Medien	79
3.6.2	Anzucht von <i>E. acidaminophilum</i> in Flüssigkulturen aus Kolonien	79
3.6.3	Untersuchung der Antibiotika-Sensitivität von <i>E. acidaminophilum</i>	80
3.6.4	Reinheitskontrolle mittels PCR bzw. Nachweis von Plasmiden in <i>E. acidaminophilum</i>	80
3.6.5	Elektroporationsexperimente	81
3.6.6	Die <i>surface layer</i> als Elektroporationshindernis?	83
3.6.7	Konjugationsexperimente	87
3.7	Untersuchungen zu Restriktionsendonukleasen von <i>E. acidaminophilum</i>	88
3.7.1	Test auf Anwesenheit von Restriktionsendonukleasen	88
3.7.2	Anreicherung einer Restriktionsendonuklease aus <i>E. acidaminophilum</i>	89
3.7.3	Bestimmung der Erkennungssequenz von <i>EacI</i>	90
3.7.4	Bestimmung der Schnittstelle von <i>EacI</i>	90
3.7.5	Klonierung und Sequenzierung des Methylase-Restriktase-Modifizierungssystems aus <i>E. acidaminophilum</i>	92
3.7.6	Charakterisierung der klonierten <i>eac</i> -Region	94
3.7.7	Überexpression von Methyltransferase und Restriktionsendonuklease in <i>E. coli</i>	95
4	Diskussion	97
4.1	Klonierung der FDH-spezifischen Gensätze und Reinigung der FDH-II	97
4.2	Aufbau und Redoxzentren von Formiat-Dehydrogenase und Hydrogenase	100
4.3	Funktion der Formiat-Dehydrogenasen im Stoffwechsel von <i>E. acidaminophilum</i>	106
4.4	Interaktion der Formiat-Dehydrogenase mit Elektronen-transferierenden Proteinen	108
4.5	Bedeutung von Wolframat und Molybdat	115
4.6	Rolle von Selen	121
4.7	Was braucht eine Formiat-Dehydrogenase um CO ₂ reduzieren zu können?	123
4.8	Aufbau eines Transformationssystems für <i>E. acidaminophilum</i>	127
4.9	Ausblick	133
5	Zusammenfassung	135
6	Literaturverzeichnis	138
	Anhang I	153
	Anhang II	166

Abkürzungsverzeichnis

AOR	Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktase
CAR	Carbonsäure-Reduktase
DIG	Digoxigenin
DTT	Dithiothreitol
F ₄₂₀	8-Hydroxy-7,8-dimethyl-5-deazariboflavin, Faktor F ₄₂₀
FDH	Formiat-Dehydrogenase
FOR	Formaldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktase
GAPOR	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Ferredoxin-Oxidoreduktase
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
MGD	Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid
MPT	Molybdopterin (Mononukleotidform)
PFL	Pyruvat-Formiat-Lyase
PFOR	Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase
Sec	Selenocystein
SLH-Domäne	<i>surface layer homology domain</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -galactosid

Weitere Abkürzungen wurden entsprechend der „Information for Authors (2000)“ des *European Journal of Biochemistry* verwendet.

1 Einleitung

Wolfram wurde durch die nahezu identischen chemischen Eigenschaften traditionell als Antagonist der biologischen Funktionen des Molybdäns betrachtet. Molybdän ist als bioaktives Metall ubiquitär verbreitet. Sowohl Eubacteria als auch Archaea und Eukarya besitzen Molybdän-abhängige Enzyme (Übersichtsartikel: KISKER et al. 1999; MENDEL 1997; HILLE 1996). Abgesehen von der Nitrogenase wird das Metall immer durch den Molybdopterin-Cofaktor komplexiert. Die Bedeutung des Cofaktors kommt auch dadurch zum Ausdruck, dass an dem Kern des Molybdopterins während der Evolution nichts geändert wurde. Auch die Biosynthese des Cofaktors ist in allen phylogenetischen Taxa konserviert. Die entsprechenden Gene wurden aus *E. coli* und anderen Bacteria sequenziert und charakterisiert, ebenso aus Archaea und Eukarya. Auch in höheren Eukaryonten wie *Arabidopsis thaliana* oder dem Menschen wurden verwandte Gene gefunden. In einigen Fällen sind während der Evolution Genfusionen aufgetreten, wobei monofunktionale Proteine zu multifunktionalen Proteinen geworden sind. Diese Tendenz wurde auch in anderen konservierten Stoffwechselwegen wie z. B. der tierischen Fettsäuresynthese beobachtet.

Die essentielle Rolle von Molybdän ist seit vielen Jahrzehnten bekannt. In vielen Organismen werden in Abwesenheit von Molybdat und Anwesenheit von Wolframat Metall-freie Molybdoenzyme oder Wolfram-substituierte Enzyme gebildet, die kaum oder gar keine Aktivität aufweisen. Erst in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden erste Hinweise erhalten, dass Wolfram das Wachstum von bestimmten acetogenen Bakterien und methanogenen Archaea stimuliert (ANDREESEN UND LJUNGDAHL 1973; ANDREESEN et al. 1974; LJUNGDAHL 1976; JONES UND STADTMAN 1977). 1983 wurde aus *Clostridium thermoaceticum* (jetzt *Moorella thermoacetica*) das erste Wolfram-abhängige Enzym, eine Formiat-Dehydrogenase, isoliert (YAMAMOTO et al. 1983). Nachfolgend wurden weitere Wolfram-abhängige Enzyme isoliert und charakterisiert: Carbonsäure-Reduktase (CAR), ebenfalls aus *M. thermoacetica* (WHITE et al. 1989), Aldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktase (AOR) aus *Pyrococcus furiosus* (MUKUND UND ADAMS 1990, 1991), Formylmethanofuran-Dehydrogenase aus *Methanobacterium wolfei* (SCHMITZ et al. 1992), Formaldehyd-Ferredoxin-Oxidoreduktase (FOR) aus *Thermococcus litoralis* (MUKUND UND ADAMS 1993), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (GAPOR) aus *P. furiosus* (MUKUND UND ADAMS 1995). Nachdem die ersten Wolfram-abhängigen Enzyme ausschließlich aus thermophilen Bacteria und hyperthermophilen Archaea isoliert wurden, konnten mit der Formiat-Dehydrogenase aus *Eubacterium acidaminophilum* (GRANDERATH 1993), Aldehyd-Dehydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* (HENSGEN et al. 1995) und der Acetylen-Hydratase aus *Pelobacter acetylenicus* (ROSNER UND SCHINK 1995) auch aus mesophilen Bakterien Wolfram-abhängige Enzyme isoliert werden. Obwohl Wolfram-abhängige Enzyme meist extrem Sauerstoff-empfindlich sind, gibt es Hinweise darauf, dass auch in einigen aeroben Bakterien Wolfram-abhängige Enzyme existieren oder Enzyme, die sowohl mit Molybdän als auch mit Wolfram aktiv sind. Zugabe von Wolframat oder Molybdat stimuliert das Wachstum des fakultativ methylophilen *Methylobacterium* sp. RXM. Die spezifische Aktivität der

Formiat-Dehydrogenase in Zell-freien Extrakten erhöhte sich mit der Verfügbarkeit von Wolframat um das 22-fache, mit Molybdat um das 5-fache (GIRIO et al. 1992). Auch in *Ralstonia eutropha* konnte bei Anwesenheit von Wolframat membrangebundene FDH-Aktivität gefunden werden (BÖMMER 1995, zitiert von BURGDORF 1998).

Die Wolfram-abhängigen Aldehyd-Oxidoreduktasen bilden die AOR-Familie (AOR, FOR, GAPOR, CAR, Aldehyd-Dehydrogenase aus *D. gigas*), die sich in deutlich von den Molybdän-abhängigen Aldehyd-Oxidoreduktasen der Xanthin-Oxidase-Familie unterscheidet (Kletzin 1997). Zwischen diesen Familien bestehen keinerlei Sequenzähnlichkeiten, auch in Art und Anzahl der Cofaktormoleküle gibt es Unterschiede. Von vielen anderen Wolfram-abhängigen Enzymen sind jedoch auch Molybdän-haltige Isoenzyme bekannt, die hohe Sequenzähnlichkeiten zueinander aufweisen, und deren Cofaktoren (abgesehen von der Art des gebundenen Metalls) keine Unterschiede aufweisen (JOHNSON et al. 1996). Diese „echten“ Isoenzyme kommen entweder in dem gleichen Organismus oder aber in verschiedenen Gattungen vor. Die Frage steht daher im Raum, welche Enzyme aus welchen hervorgegangen sind.

Vergleicht man die Verfügbarkeiten der Metalle Wolfram und Molybdän, so stellt man fest, dass in Meer- und Süßwasser Molybdän in größeren Mengen als Wolfram vorliegt, wohingegen in Hydrothermalquellen der Tiefsee die Wolframkonzentration höher ist als die Molybdänkonzentration. Außerdem liegt dort Molybdän überwiegend in der Oxidationsstufe +IV als unlösliches MoS_2 vor, während Wolfram zum Teil als biologisch verfügbares Wolframat mit der Oxidationsstufe +VI vorliegt (KLETZIN UND ADAMS 1996). Aufgrund der besseren Verfügbarkeit von Wolframat gegenüber Molybdat an hyperthermophilen Standorten ist die strikte Wolfram-Abhängigkeit von hyperthermophilen Organismen wie z. B. *P. furiosus* zu erklären.

Es existieren verschiedene Theorien darüber, wie das Leben auf der Erde entstanden ist. Eine nachvollziehbare Theorie geht davon aus, dass das Leben unter Bedingungen entstanden ist, die denen der heutigen Hydrothermalquellen vergleichbar sind. Es wäre also durchaus denkbar, dass die ersten Molybdopterin-Cofaktoren Wolfram enthielten (ADAMS 1993). Mit zunehmender Abkühlung der Erde und Anstieg der Verfügbarkeit von Molybdän könnten sich von einigen Enzymen Molybdän-haltige Isoenzyme gebildet haben, sowie neue Molybdoenzyme entstanden sein, die keine Aktivität mehr mit Wolfram aufweisen. Auch die Sauerstoff-Empfindlichkeit passt ins Bild: der größte Teil der Wolfram-abhängigen Enzyme ist extrem Sauerstoff-empfindlich, zu Beginn des Lebens war die Welt anoxisch, so dass dies kein Problem dargestellt hätte.

Reaktionen mit niedrigem Redoxpotential wie der Reduktion von Carbonsäuren zu Aldehyden oder der Reduktion von CO_2 zu Formiat, können vermutlich mit hoher Effizienz nur durch Wolfram-haltige Enzyme katalysiert werden, so dass mesophile Organismen, die von diesen Reaktionen abhängig waren, die

niedrigere Verfügbarkeit von Wolframat gegenüber Molybdän durch ein effizientes Aufnahmesystem kompensiert haben könnten.

Formiat-Dehydrogenasen kommen in den unterschiedlichsten Mikroorganismen vor, so in anaeroben Bakterien und Archaea, fakultativ anaeroben und aeroben Bakterien und Hefen. Formiat wird in sehr unterschiedlichen Stoffwechselwegen produziert oder verwertet, was sich auch im Aufbau der Enzyme widerspiegelt. Nach der physiologischen Funktion können die Formiat-Dehydrogenase in fünf Gruppen eingeteilt werden:

1. Anaerobe respiratorische oder trimere Formiat-Dehydrogenasen

In Organismen, die eine anaerobe Atmung durch die Reduktion terminaler Elektronenakzeptoren wie z. B. Nitrat, Fumarat oder DMSO betreiben können, dient Formiat als Elektronendonator. Die Formiat-Dehydrogenasen sind membrangebunden und besitzen als redoxaktive Gruppen den Molybdopterin-Cofaktor sowie Eisen-Schwefel-Zentren und ein membranintegrales Cytochrom. Formiat-Dehydrogenasen dieses Typs sind z. B. FDH-N und FDH-O aus *E. coli* (BERG et al. 1991; PLUNKETT et al. 1993), die beiden Formiat-Dehydrogenasen aus *Wolinella succinogenes* (BOKRANZ et al. 1991; Lenger et al. 1997), Formiat-Dehydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (SEBBAN et al. 1995) und *D. desulfuricans* (COSTA et al. 1997). In manchen dieser Formiat-Dehydrogenasen ist Selenocystein an der Koordinierung des Molybdäns beteiligt, so in FDH-N und FDH-O aus *E. coli* sowie der Formiat-Dehydrogenase aus *D. desulfuricans*. In den übrigen Enzymen ist das Selenocystein durch Cystein ersetzt.

2. Fermentative Formiat-Dehydrogenasen, CO₂-Reduktasen

Die Formiat-Dehydrogenase kann in einer Doppelfunktion an fermentativen Prozessen in anaeroben Gram-positiven Bakterien beteiligt sein. Die Formiat-Dehydrogenase kann durch die Formiat-Oxidation Reduktionsäquivalente zur Verfügung stellen, andererseits bei manchen Organismen aber auch die thermodynamisch ungünstige CO₂-Reduktion katalysieren und so Reduktionsäquivalente verbrauchen.

Verschiedene strikt anaerobe, Gram-positive Bakterien sind in der Lage, die bei der Fermentation von Zuckern, Purinen oder Aminosäuren entstehenden Reduktionsäquivalente durch Reduktion von CO₂ via Formiat zu Acetat zu verbrauchen. Die einleitende Reaktion ist dabei die Reduktion von CO₂ durch eine Formiat-Dehydrogenase, unabhängig davon, ob die Acetat-Synthese wie bei den homoacetogenen Bakterien über den Wood-Weg oder wie bei purinolytischen Clostridien bzw. Aminosäure-Vergärem über den Glycin-Weg erfolgt (FUCHS 1986; ANDREESEN 1994a). Diese Formiat-Dehydrogenasen sind oft als Wolfram- und Selen-abhängige, extrem Sauerstoff-empfindliche Enzyme beschrieben worden, so z. B. aus *Clostridium formicoaceticum* und *C. acidurici* (LEONHARDT UND ANDREESEN 1977; WAGNER UND ANDREESEN 1977). Die ebenfalls Wolfram- und Selen-abhängige Formiat-Dehydrogenase aus *M. thermoacetica* wurde isoliert und charakteri-

siert (YAMAMOTO et al. 1983; DEATON et al. 1987), auch die DNA-Sequenz wurde bestimmt (X.-L. LI, L.G. LJUNGDAHL UND D.J. GOLLIN, unveröffentlichte Ergebnisse; Acc. Nr. U73807).

Die Formiat-Dehydrogenase kann aber auch z. B. in Aminosäure-vergärenden Bakterien als Elektronenlieferant für die Reduktion von Glycin, Betain und Sarkosin dienen und katalysiert die letzte Stufe der Oxidation von Glycin zu CO₂ (ANDREESEN 1994b).

Die FDH-H von *E. coli* lässt sich am ehesten der Gruppe der fermentativen Formiat-Dehydrogenasen zuordnen. FDH-H ist eine Komponente des Formiat-Hydrogen-Lyase-Systems, das nur unter anaeroben Bedingungen unter Abwesenheit von Nitrat exprimiert wird, und Formiat zu CO₂ und H₂ umsetzt. Das die FDH-H codierende *fdhF*-Gen ist monocistronisch und enthält ein *in-frame* TGA-Codon. Die FDH-H weist zu den katalytischen Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenase z. B. aus *M. thermoacetica*, *M. formicicum* oder *R. eutropha* höhere Homologien auf als zu denen der respiratorischen FDH-N und FDH-O.

3. Formiat-Dehydrogenasen aus methanogenen Archaea

Einige methanogene Archaea können neben CO₂ und H₂ auch Formiat als Substrat verwenden. Die Formiat-Dehydrogenase ist ein Membran-assoziiertes Enzym und koppelt die Oxidation des Formiats mit der Reduktion von F₄₂₀, das in der Methanogenese als Reduktionsäquivalent dient. Die Formiat-Dehydrogenase aus *Methanobacterium formicicum* besteht aus zwei Untereinheiten, der katalytischen, die den Molybdopterin-Cofaktor sowie ein [4Fe-4S]-Zentrum enthält, und einer elektronentransferierenden Untereinheit, die zwei weitere [4Fe-4S]-Zentren aufweist (SCHAUER UND FERRY 1986).

4. Formiat-Dehydrogenasen aus fakultativ chemoautotrophen Bakterien

Einige Bakterien vermögen unter aeroben Bedingungen auf Formiat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle autotroph zu wachsen. Formiat wird durch eine lösliche NAD-abhängige Formiat-Dehydrogenase (S-FDH) zu CO₂ oxidiert und die entstehenden Reduktionsäquivalente zur Assimilation des CO₂ über den Calvin-Cyclus verwendet oder zur Energiekonservierung in die Atmungskette eingeschleust. Die Formiat-Dehydrogenase wurde aus *R. eutropha* (früher *Alcaligenes eutrophus*) eingehend untersucht. Die S-FDH wurde isoliert und charakterisiert (FRIEDEBOLD et al. 1995; FRIEDEBOLD UND BOWIEN 1993), sowie die korrespondierenden Gene kloniert und deren Transkriptionsregulation untersucht (OH UND BOWIEN 1999; 1998). Die S-FDH ist ein heterotetrameres Enzym, das einen Molybdopterin-Cofaktor, FMN, sowie zahlreiche Eisen-Schwefel-Zentren besitzt. Ähnlich aufgebaute Molybdo-Eisen-Schwefel-Flavoproteine wurden außerdem in *Methylosinus trichosporium*, *Methylobacterium* sp. RXM sowie in *Pseudomonas oxalaticus* beschrieben (JOLLIE UND LIPSCOMB 1991; DUARTE et al. 1997; MÜLLER et al. 1978).

R. eutropha besitzt noch eine zweite, Membran-gebundene Formiat-Dehydrogenase (M-FDH), die die bei der Formiat-Oxidation freiwerdenden Reduktionsäquivalente vermutlich über einen bisher unbekanntem Elektronenakzeptor direkt in die Atmungskette einspeist (FRIEDRICH et al. 1979).

5. Formiat-Dehydrogenasen aus methylotrophen Bakterien und Hefen

Aerobe methylotrophe Bakterien und Hefen nutzen C_1 -Verbindungen wie Methanol, Methan oder Methylamin als Kohlenstoff- und Energiequelle. Diese Substrate werden zu CO_2 oxidiert, wobei intermediär Formiat entsteht. Die NAD-abhängigen Formiat-Dehydrogenasen dieser Organismen sind Homodimere und enthalten weder Cofaktoren noch Metalle. Die entstehenden Reduktionsäquivalente werden in die Atmungskette eingespeist. Die Proteinsequenzen dieser Formiat-Dehydrogenasen weisen hohe Ähnlichkeiten zueinander auf (GALKIN et al. 1995). Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten kann auch die homodimere Formiat-Dehydrogenase, die aus Mitochondrien nicht-photosynthetisch aktiver, pflanzlicher Gewebe isoliert wurde, in diese Gruppe eingeordnet werden (COLAS DES FRANCS-SMALL et al. 1993).

Die Enzyme aus *M. trichosporium* und *Methylobacterium* sp. RXM stellen Ausnahmen dieser Gruppe dar. Die Formiat-Dehydrogenasen dieser Organismen weisen einen komplexen Aufbau ähnlich der Formiat-Dehydrogenase von *R. eutropha* auf und besitzen Molybdän und Eisen-Schwefel-Zentren (JOLLIE UND LIPSCOMB 1991).

Die katalytischen Untereinheiten der fermentativen Formiat-Dehydrogenasen, der Formiat-Dehydrogenasen aus methanogenen Archaea sowie aus fakultativ chemolithotrophen Bakterien und FDH-H aus *E. coli* weisen untereinander hohe Sequenzähnlichkeiten auf. Geringe Homologien bestehen zu der Gruppe der respiratorischen Formiat-Dehydrogenasen, gar keine zu den Metall- und Cofaktorfreen Formiat-Dehydrogenasen aus methylotrophen Bakterien und Hefen.

Eubacterium acidaminophilum ist ein obligat anaerober, Gram-positiver Organismus (ZINDEL et al. 1988), der zusammen mit *Clostridium sticklandii* und *Clostridium litorale* in das Cluster XI der Clostridien eingeordnet wird (BAENA et al. 1999; COLLINS et al. 1994). *E. acidaminophilum* ist in der Lage, Glycin oder Serin als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwenden.

Glycin wird durch die Glycin-Reduktase zu Acetat, CO_2 und Ammoniak reduziert, wobei durch Substratkettenphosphorylierung ein ATP gewonnen werden kann (ANDREESEN 1994b). Die für die Reduktion des Glycins notwendigen Reduktionsäquivalente werden durch Oxidation eines Teils des Glycins zur Verfügung gestellt. Intermediär entsteht dabei Formiat, das durch die Formiat-Dehydrogenase zu CO_2 oxidiert wird. Neben Glycin können auch die N-Methyl-Derivate des Glycins, Sarkosin und Betain, durch die mit der Glycin-Reduktase verwandten Sarkosin- und Betain-Reduktase unter Energiekonservierung umgesetzt werden. Im Gegensatz zu Glycin können diese Substrate nicht oxidiert werden, so dass ein Elektronendonator wie z. B. Formiat zugesetzt werden muss. Die Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase aus *E. acidaminophilum* wurde und wird intensiv untersucht (WAGNER et al. 1999; MEYER et al. 1995; LÜBBERS UND ANDREESEN 1993).

Serin wird über Pyruvat als Intermediat zu Acetat und CO₂ oxidiert. Die entstehenden Reduktionsäquivalente werden durch Wasserstoff-Freisetzung abgegeben. An der Umsetzung beteiligte Enzyme wie Serin-Dehydratase, Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase und Hydrogenase konnten nachgewiesen werden (ZINDEL et al. 1988; CLAAS 1991).

Der Abbau der Aminosäuren Alanin, Aspartat, Leucin, Valin sowie von Malat erfolgt nur in Anwesenheit eines reduzierbaren Substrates oder in Cokultur mit einem Wasserstoff- oder Formiat-verwertenden Organismus (ZINDEL et al. 1988).

Die Formiat-Dehydrogenase aus *E. acidaminophilum* wurde von GRANDERATH (1993) partiell angereichert und charakterisiert. Es handelt sich um ein sehr Sauerstoff-empfindliches, Wolfram-abhängiges Enzym, das neben der Formiat-Oxidation auch die Reduktion von CO₂ katalysieren kann. Wegen des generellen Selenbedarfs von *E. acidaminophilum* war es nicht möglich, über physiologische Versuche zu klären, ob Selenocystein Bestandteil der Formiat-Dehydrogenase ist (WAGNER 1997; ZINDEL et al. 1988). Die hochaktive Formiat-Dehydrogenase liegt nur in geringen Mengen in der Zelle vor. Im Rohextrakt konnte NADP-abhängige FDH-Aktivität gemessen werden, die während der Anreicherung aber verloren ging. Die Benzyl- und Methylviologen-abhängige Aktivität konnte einem 95 kDa-Protein zugeordnet werden (GRANDERATH 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Formiat-Dehydrogenase von *E. acidaminophilum* auf Gen- und Transkriptionsebene charakterisiert. Zudem war es Ziel der Arbeit, ein Transformationssystem für *E. acidaminophilum* zu entwickeln, mit dem z. B. die Formiat-Dehydrogenase homolog überexprimiert werden könnte. Der mit *E. acidaminophilum* verwandte Aminosäure-vergärende Anaerobier *Clostridium sticklandii* sollte bei den geplanten Arbeiten als Referenz-Organismus mit untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Organismen und mikrobiologische Methoden

Medien und Stammhaltung

Alle Nährmedien oder ihre Zusätze wurden bei 121 °C für 25 min autoklaviert bzw. bei Hitzeinstabilität sterilfiltriert.

Die für die Anzucht von *E. acidaminophilum* und *C. sticklandii* benötigten Medien wurden nach der von HUNGATE (1969) beschriebenen Arbeitstechnik hergestellt. Nach dem Lösen aller Komponenten erfolgte ein 10-minütiges Kochen der Nährmedien zur Beseitigung des Sauerstoffes und eine Abkühlung unter Stickstoff-Begasung. Anschließend wurden sie in vorher ebenfalls mit Stickstoff begaste Hungate-Röhrchen und Serumflaschen abgefüllt und autoklaviert. Der N₂-Gasstrom wurde zur Beseitigung des Restsauerstoffs über einen erhitzten Kupferkatalysator geleitet.

Die Stammhaltung von *E. acidaminophilum* und *C. sticklandii* erfolgte anaerob in Hungate-Röhrchen mit Butylgummistopfen (Bellco Glass Inc., Vineland, New Jersey, USA). Alle 14 Tage wurden die Kulturen 10 %ig in frisches Nährmedium überimpft, bei 30 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Anzuchten bis zu 1 l wurden in Schraubverschlußflaschen (Müller & Krempel, Zürich, Schweiz) mit Latex-Gummisepten (Maag, Dübendorf) durchgeführt.

Organismen und Anzucht von *E. acidaminophilum*, *C. sticklandii*, *E. coli* und *E. faecalis*

Eubacterium acidaminophilum al-2 (DSM 3953^T) wurde unter anaeroben Bedingungen bei 30 bis 37 °C kultiviert.

Medium für *E. acidaminophilum* (ZINDEL et al. 1988, mod.):

C-Quelle (s. u.)				
20x Salzlösung	50	ml		
Spurenelementlösung A	1	ml		
Resazurin (1 mg/ml)	1	ml	1	mg/l
Biotin ^a (10 mg/l)	2	ml	82	nM
NaHCO ₃ ^a (84 g/l)	50	ml	50	mM
Na ₂ S x 9 H ₂ O ^a (60 g/l)	10,8	ml	2,7	mM
H ₂ O bidest.	ad 1000	ml		

^a Die Stammlösungen wurden in abgekochtem Wasser separat angesetzt, autoklaviert (Biotin nur 10 min bei 121 °C) und dem Medium nach dem Autoklavieren steril zugegeben, anschließend wurde der pH-Wert mit steriler 1 M HCl zwischen 7,2 und 7,4 eingestellt.

Folgende C-Quellen wurden eingesetzt:

Glycin	50 mM
Serin/Formiat/Betain (SFB)	10 mM / 40 mM / 70 mM
Serin/Formiat/Betain (SFB)	40 mM / 30 mM / 20 mM
Serin/Formiat/Sarkosin	40 mM / 30 mM / 20 mM
Serin/Formiat/Sarkosin	10 mM / 50 mM / 50 mM
Serin/Formiat	40 mM / 30 mM
Serin	40 mM

20x Salzlösung

KH ₂ PO ₄	4	g	1,5	mM
NaCl	20	g	17	mM
KCl	10	g	6,7	mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10	g	2	mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	3	g	1	mM
NH ₄ Cl	5	g	3,5	mM
H ₂ O bidest.	ad 1000	ml		

Spurenelementlösung SL A (HORMANN UND ANDREESEN 1989, mod.)

HCl (25%)	10	ml		
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	1,5	g	7,5·10 ⁻⁶	M
ZnCl ₂	0,07	g	5,1·10 ⁻⁷	M
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,1	g	5,1·10 ⁻⁷	M
H ₃ BO ₄	0,006	g	9,7·10 ⁻⁸	M
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,19	g	8,0·10 ⁻⁷	M
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,002	g	1,2·10 ⁻⁸	M
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,024	g	1,0·10 ⁻⁷	M
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,263	g	1,0·10 ⁻⁶	M
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,036	g	1,5·10 ⁻⁷	M
Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O	0,033	g	1,0·10 ⁻⁷	M
H ₂ O bidest.	ad 1000	ml		

FeCl₂ wurde zunächst in HCl (25 %) vollständig gelöst. Danach erfolgte die Zugabe der übrigen Salze. Bei Zugabe von 1 ml auf 1 l Medium lagen die Spurenelemente in den angegebenen Konzentrationen vor.

Feste Nährmedien

Neben dem im folgenden beschriebenen festen Glycin-Medium kamen als C-Quellen auch Serin/Formiat/Glycin (SFG; 40/30/20 mM) und Serin/Formiat/Betain (40/30/20 mM) zur Anwendung. Zur Selektion von *E. acidaminophilum* gegen *E. faecalis* wurde teilweise Glycin-Medium ohne Hefeextrakt verwendet.

Glycin	3,72	g	50	mM
20x Salzlösung	50	ml		
MOPS	10,46	g	50	mM
Hefeextrakt	1	g	0,1	%
Spurenelementlösung (SL A)	1	ml		
Resazurin (1mg/mL)	1	ml		
H ₂ O bidest.	ad 997	ml	pH 7,2 (NaOH)	

Das Medium wurde ca. 10 min gekocht, wobei gegen Ende der Kochzeit 15 g (1,5 %) Agar hinzugefügt wurden. Anschließend wurde das Medium unter N₂-Begasung auf ca. 55 °C abgekühlt, in Serumflaschen abgefüllt und bis zum Festwerden weiter mit Stickstoff begast.

Nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen auf ca. 55 °C wurden die folgenden Komponenten steril und anaerob hinzugefügt:

Cystein-HCl (5 %; pH 7,2)	1	ml	0,4	mM
Biotin (10 mg/l)	2	ml	82	nM

Danach wurde das Medium in der Anaerobenbox in sterile Petrischalen gegossen und bis zur Verwendung unter anaeroben Bedingungen gelagert.

Clostridium sticklandii HF (DSM 519^T) wurde unter anaeroben Bedingungen bei 30 °C auf Minimalmedium nach UHDE (1990) kultiviert.

Medium für *Clostridium sticklandii*

L-Serin	2,1	g	20	mM
L-Threonin	2,4	g	20	mM
L-Arginin	3,5	g	20	mM
L-Lysin-HCl	3,65	g	20	mM
L-Histidin	0,47	g	3	mM
L-Tyrosin	0,02	g	0,11	mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2	g	0,81	mM
NH ₄ Cl	0,5	g	9,3	mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (10 g/l)	1	ml	68	µM
Kaliumphosphatpuffer (1 M; pH 7,0)	10	ml	10	mM
Aminosäure-Stammlösung 2	20	ml		
Spurenelementlösung SL A	1	ml		
Vitaminlösung ^a	5	ml		
NaHCO ₃ ^a (84 g/l)	10	ml	10	mM
Na ₂ S x 9 H ₂ O ^a (60 g/l)	5	ml	1,25	mM
Resazurin (1 g/l)	1	ml		
H ₂ O dest.	ad 1000	ml	pH 6,8 - 6,9	

^a Die Stammlösungen wurden in abgekochtem Wasser separat angesetzt, autoklaviert bzw. sterilfiltriert und dem Medium nach dem Autoklavieren steril zugegeben. Der pH-Wert wurde nach Zugabe dieser Bestandteile auf 7,2 - 7,4 bestimmt.

Aminosäure-Stammlösung 2

L-Valin	2,93	g
L-Leucin	3,28	g
L-Isoleucin	3,28	g
L-Prolin	2,88	g
L-Cystein	3,03	g
L-Methionin	3,73	g
L-Phenylalanin	4,13	g
L-Tryptophan	5,11	g

L-Glutamat	3,68	g
L-Glutamin	3,66	g
L-Asparagin	3,75	g
H ₂ O dest.	ad 1000	ml

Bei Zugabe von 20 ml Aminosäure-Stammlösung 2 zu 980 ml Medium lagen alle in der Stammlösung enthaltenen Aminosäuren in einer Konzentration von 0,5 mM vor.

Vitaminlösung (GENTHNER et al., 1981, modifiziert)

Pantothersäure	50	mg
Riboflavin	50	mg
Pyridoxamin-HCl	10	mg
D-(+)-Biotin	20	mg
Folsäure	20	mg
Nicotinsäure	25	mg
Nicotinamid	25	mg
α-Liponsäure	60	mg
p-Aminobenzoessäure	50	mg
Thiamin-HCl	50	mg
Vitamin B ₁₂	50	mg
H ₂ O dest.	ad 1000	ml

Die Vitaminlösung wurde sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide sind in Tabelle 1 aufgeführt. *Escherichia coli*-Stämme wurden, soweit nicht gesondert erwähnt, auf Vollmedium (Luria Bertani) aerob bei 37 °C gezüchtet. Das Medium wurde, wie bei SAMBROOK et al. (1989) beschrieben, hergestellt und je nach Versuchsansatz mit Antibiotika und Nachweisreagenzien supplementiert. Die Endkonzentrationen betragen: 125 µg/ml für Ampicillin, 20 µg/ml für Kanamycin, 12,5 µg/ml für Tetracyclin, 48 µg/ml für X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid), 40 µg/ml für IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid). *E. coli* XL1 Blue MRF' wurde, wenn er als Wirtsorganismus für die Phageninfektion dienen sollte, in LB-Medium, das mit 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄ supplementiert war, bei 30 °C angezogen.

Enterococcus faecalis CG120 (pAM211) wurde in MRS-Medium (Difco, Beckon Dickinson, Sparks, USA), dessen pH-Wert auf 7,2 eingestellt wurde, bei 37 °C ohne Schütteln angezogen.

Reinheitskontrolle

Zur Überprüfung der Reinheit einer Bakterienkultur wurde die Einheitlichkeit der Zellen im Phasenkontrastmikroskop (Axiolab, Carl Zeiss, Oberkochen) begutachtet. Außerdem wurden Proben der Kulturen von *E. acidaminophilum* auf Glycin-Platten ausgestrichen, um die Koloniemorphologie zu prüfen. Als

weitere Art der Reinheitskontrolle erfolgten für *E. acidaminophilum* spezifische PCRs bzw. Kontrolle der 16S rDNA.

Da die verwendeten *E. coli*-Stämme Antibiotika-Resistenzen aufwiesen, wurde nur eine makroskopische Reinheitskontrolle auf den entsprechenden LB-Agar-Platten durchgeführt.

Tabelle 1: Stämme, Bakteriophagen und Plasmide für molekularbiologische Untersuchungen

	Beschreibung ¹	Referenz
<u>Bakterienstämme</u>		
<i>Eubacterium acidaminophilum</i> al-2 (DSM 3953 ^T)	Wildtyp	ZINDEL et al. 1988
<i>Clostridium sticklandii</i> HF (DSM 519 ^T)	Wildtyp	STADTMAN UND MCCLUNG 1957
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue MRF [']	$\Delta(mcrA)$ 183 $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F ['] <i>proAB lacI^q ZAM15 Tn10</i> (Tc ^R)]	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> SOLR TM	e14 ⁻ (McrA ⁻) $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 171 <i>sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5</i> (Kan ^R) <i>lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1</i> λ^R [F ['] <i>proAB lacI^q ZAM15</i>] Su ⁻	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> B ER2566	F ⁻ λ^- <i>fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11</i> $\Delta(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10)2 R(zgb-210::Tn10)1$ (<i>TetS</i>) <i>endA1 [dcm]</i>	New England Biolabs
<i>Escherichia coli</i> BL21-Codon-Plus(DE3)-RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tc^R gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte [argU ileY leuW Cam^R]</i>	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> SCS110	<i>rpsL</i> (Str ^R) <i>thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44</i> $\Delta(lac-proAB)$ [F ['] <i>traD36 proAB laqI^q ZAM15</i>]	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> HB101	F ⁻ , <i>pro⁻, leu⁻, thi⁻, lacY, Sm^R, endoI⁻, recA⁻</i>	Promega
<i>Escherichia coli</i> S17/1	Tp ^R , Sm ^R , <i>pro, tra⁺, mob⁺, recA, IncP</i>	SIMON et al. 1983
<i>Enterococcus faecalis</i> CG120 (pAM211)	Tc ^R	GAWRON-BURKE UND CLEWELL 1984
<u>Bakteriophagen</u>		
ExAssist TM	Helferphage zum Ausschneiden des pBluescript SK ⁺ -Phagemids aus dem Lambda ZAP II Insertionsvektor	Stratagene
Lambda ZAP II-Phagenbank al-2	Lambda ZAP II-Phagen, <i>EcoRI</i> -Fragmente (5-10 kb) von <i>E. acidaminophilum</i> enthaltend	diese Arbeit
Lambda ZAP II-Phagenbank <i>C. sticklandii</i>	Lambda ZAP II-Phagen, <i>EcoRI</i> -Fragmente (5-10 kb) von <i>C. sticklandii</i> enthaltend	GRAENTZDOERFFER et al. 2000
<u>Plasmide</u>		
pBluescript SK+ pGEM-T-easy	Phagemid-Klonierungsvektor (2,96 kb); Amp ^R , <i>lacPOZ'</i> Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten (3,02 kb); Amp ^R , <i>lacPOZ'</i>	Stratagene Promega
pTYB2	Expressionsvektor des IMPACT-Systems (7,28 kb); Amp ^R	New England Biolabs
pASK-IBA3	Vektor zur Expression von Proteinen mit C-terminaler <i>Strep-tag</i> -Fusion (3,25 kb); Amp ^R	IBA

Fortsetzung Tabelle 1

pASK-IBA7	Vektor zur Expression von Proteinen mit N-terminaler <i>Strep-tag</i> -Fusion (3,25 kb); Amp ^R	IBA
pUBS520	ArgU-exprimierender Vektor mit pACYC-Origin (5,3 kb); Km ^R	BRINKMANN 1990
pFDH1/1	pUC18, aus <i>Sau</i> IIIA-Plasmidbank von <i>E. acidaminophilum</i> mit 3,1 kb-Fragment (<i>fdh</i> -Operon I)	diese Arbeit
pFDH1/2	pUC18, aus <i>Sau</i> IIIA-Plasmidbank von <i>E. acidaminophilum</i> mit 1,2 kb-Fragment (<i>fdh</i> -Operon I)	diese Arbeit
pFDH1/3	pBluescript KS+, aus λ -ZAP II-Cosmidbank von <i>E. acidaminophilum</i> mit 7,4 kb-Fragment (<i>fdh</i> -Operon I)	diese Arbeit
pFDH2/1	pUC18, aus <i>Sau</i> IIIA-Plasmidbank von <i>E. acidaminophilum</i> mit 3,7 kb-Fragment (<i>fdh</i> -Operon II)	diese Arbeit
pFDH2/2	pBluescript KS+, aus λ -ZAP II-Cosmidbank von <i>E. acidaminophilum</i> mit 7,2 kb-Fragment (<i>fdh</i> -Operon II)	diese Arbeit
pFDH2/3	pBluescript KS+, aus λ -ZAP II-Cosmidbank von <i>E. acidaminophilum</i> mit 8,1 kb-Fragment (<i>fdh</i> -Operon II)	diese Arbeit
pHYD2	pBluescript KS+, aus λ -ZAP II-Cosmidbank von <i>E. acidaminophilum</i> mit 6,9 kb-Fragment (<i>hym</i> -Operon)	diese Arbeit
pCSFDH1	pBluescript KS+, aus λ -ZAP II-Cosmidbank von <i>C. sticklandii</i> mit 6,1 kb-Fragment (<i>fdh</i> -Operon, <i>aor/car</i>)	diese Arbeit
pFdhA1-Impact	<i>fdhA1</i> (U/C) in pTYB2	diese Arbeit
pFdhB1-Impact	<i>fdhB1</i> in pTYB2	diese Arbeit
pFdhA1	<i>fdhA1</i> (Wildtyp) in pASK-IBA7	diese Arbeit
pFdhA1-U/C	<i>fdhA1</i> (U/C) in pASK-IBA7	diese Arbeit
p Δ N-FdhA1	<i>fdhA1</i> (Wildtyp, N-terminal verkürzt) in pASK-IBA7	diese Arbeit
p Δ N-FdhA1-U/C	<i>fdhA1</i> (U/C, N-terminal verkürzt) in pASK-IBA7	diese Arbeit
pIMP1	Shuttle-Vektor (4,8 kb); Amp ^R , Em ^R , ColE1- / pIM13-Origin	MERMELSTEIN et al. 1992
pIMP1:: <i>tetL</i>	Shuttle-Vektor (6,8 kb); Amp ^R , Em ^R , Tc ^R , ColE1- / pIM13-Origin	BÖHRINGER 1997
pMTL500E	Shuttle-Vektor (6,43 kb), Amp ^R , Em ^R , ColE1- / pAM β 1-Origin	OULTRAM et al. 1988
pJIR418	Shuttle-Vektor (7,36 kb), Cm ^R , Em ^R , ColE1- / pIP404-Origin	SLOAN et al. 1992
pJIR750	Shuttle-Vektor (6,57 kb), Cm ^R , ColE1- / pIP404-Origin	BANNAM UND ROOD 1993
pJIR751	Shuttle-Vektor (5,95 kb), Em ^R , ColE1- / pIP404-Origin	BANNAM UND ROOD 1993
pSYL2	Shuttle-Vektor (8,7 kb), Tc ^R , Em ^R , ColE1- / pCBU2-Origin	LEE et al. 1992
pSYL7	Shuttle-Vektor (9,2 kb), Tc ^R , Em ^R , ColE1- / pJU122-Origin	LEE et al. 1992
pMS4	Shuttle-Vektor (10,99 kb), Tc ^R , ColE1- / pAM β 1-Origin	STRÄTZ 1991
pAM120	mit konj. Transposon Tn916 (21,4 kb); Tc ^R , Amp ^R	GAWRON-BURKE UND CLEWELL 1984
pKV12	konj. Plasmid (14,4 kb); Km ^R , Tc ^R , ColE1- / pAM β 1-Origin, oriT von RK2	STRÄTZ 1991
p <i>EacI</i> -1	pUC18, aus <i>Sau</i> IIIA-Plasmidbank von <i>E. acidaminophilum</i> mit 2,7 kb-Fragment (<i>meacI</i>)	diese Arbeit
p <i>EacI</i> -Ph5-1	pBluescript KS+, aus λ -ZAP II-Cosmidbank von <i>E. acidaminophilum</i> mit 4,5 kb-Fragment (<i>eac</i> -Operon)	diese Arbeit
p <i>REacI</i>	<i>reacI</i> in pASK-IBA7	diese Arbeit
p <i>MEacI</i>	<i>meacI</i> in pASK-IBA7	diese Arbeit
p <i>MREacI</i>	<i>meacI</i> in pASK-IBA3	diese Arbeit
pFD-1	pUC18, aus <i>Sau</i> IIIA-Plasmidbank von <i>E. acidaminophilum</i> mit 1,5 kb-Fragment (<i>fdxA</i> -Gen)	diese Arbeit

¹ Relevante Merkmale: Amp^R: Ampicillin-Resistenz; Cm^R: Chloramphenicol-Resistenz; Em^R: Erythromycin-Resistenz; Km^R: Kanamycin-Resistenz; Sm^R: Streptomycin-Resistenz; Tc^R: Tetracyclin-Resistenz; Tp^R: Trimethoprim-Resistenz

Zellernte, Zellaufschluss und Herstellung von Zellextrakten

Die Kulturen wurden gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Kleinere Kulturen wurden in einem JA-20 Rotor in einer Beckmann-J2-21M-Zentrifuge 15 min bei 15.000 rpm und 4 °C geerntet und direkt verwendet. Größere Mengen an Zellmaterial von *E. acidaminophilum* für Proteinreinigungen wurden freundlicherweise von David Rauh (Serin- bzw. Serin/Formiat-Zellen) und Tina Parther (Glycin-Zellen) nach Anzucht in einem 100 l-Stahlfermenter zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden in dem jeweiligen Aufschlusspuffer aufgenommen (1 g Zellen/2 ml Puffer). Nach Zugabe von 1 mg Lysozym, 0,1 mg DNase I und 1 µl PMSF (0,1 M in 2-Propanol) pro ml Puffer wurde die Zellsuspension 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden durch zwei- bis dreimalige Passage durch eine vorgekühlte 20K- bzw. 40K-French-Press-Zelle (SLM Instruments, Inc., Silver Spring, USA) bei ~140 MPa bzw. ~280 MPa aufgeschlossen und anschließend mit 14.000 rpm in der Tischzentrifuge bei Raumtemperatur (Eppendorf-Gefäße) oder mit 20.000 rpm in der Beckmann-Zentrifuge bei 4 °C (SS 34-Röhrchen) zentrifugiert. Der Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet.

Zentrifugation

Sofern nicht anders beschrieben, wurden bei Arbeiten mit Nukleinsäuren und Zellextrakten die in Tabelle 2 aufgeführten Zentrifugen und Rotoren genutzt.

Tabelle 2: Zentrifugen und Rotoren

Zentrifuge (Hersteller)	Gefäß	Rotor	Geschwindigkeit [rpm]
Universal 30 RF und EBA 12 R	SS 34-Röhrchen	1415	11.000
(Hettich, Tuttlingen)	Eppendorf-Reaktionsgefäß	1412	bis 15.000
	Greiner-Röhrchen	1424A	bis 5.000
Zentrifuge RC 5 C (Sorvall, Hanau)	500-ml-Polypropylenflaschen	GS-3	8.000
Zentrifuge J2-21M (Beckman, Palo Alto, CA, USA)	SS 34-Röhrchen	JA 20	20.000

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren und Restriktion von DNA

Präparation genomischer DNA aus *E. acidaminophilum* (SAITO UND MIURA 1963, mod.)

3 g Zellen wurden in 4 ml Saline-EDTA-Lösung (0,15 M NaCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) suspendiert, mit 6 mg Lysozym versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 25 ml Tris/SDS-Puffer (0,1 M Tris, pH 9,0, 0,1 M NaCl, 1 % SDS) hinzugefügt. Die Suspension wurde bis zur vollständigen Lyse der Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 60 °C aufgetaut (mindestens 5-mal). Je 15 ml der Suspension wurden mit 10 ml Phenol (Tris-gesättigt, pH 8,0; Roth, Karlsruhe) versetzt, vorsichtig geschüttelt und 20 bis 30 min unter gelegentlichem Schütteln auf Eis gelagert. Anschließend wurde bei 5.000 rpm bei 4 °C für 5 min zentrifugiert, die obere Phase abgenommen, erneut mit 10 ml Phenol versetzt und erneut zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, mit 2 Vol. eiskaltem 96 % Ethanol versetzt und zur Fällung der Nukleinsäure über Nacht bei -20°C inkubiert. Die ausgefallene DNA wurde bei 20.000 rpm bei 4 °C für 15 min pelletiert. Das Pellet wurde in 5 ml 1 × SSC (20 × SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0) gelöst. Anschließend wurden 0,5 ml 10 × SSC und 11 µl RNase (10 mg/ml) zugegeben und 45 min bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der RNase wurden 5 ml Phenol hinzugefügt, geschwenkt und bei 5.000 rpm bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgehoben und mit 2,5 Vol. eiskaltem 96 % Ethanol 2 h oder über Nacht gefällt und anschließend bei 20.000 rpm bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde nacheinander mit 70 %, 80 %, 90 %igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung bei Raumtemperatur wurde das Pellet in 10 ml 1 × SSC aufgenommen und 1,1 ml Acetat-EDTA-Lösung (3 M Na-Acetat, pH 7,0; 1 M EDTA) und 11 ml Isopropanol hinzugefügt. Die ausgefallenen Nukleinsäuren wurden pelletiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, 20 min getrocknet und in 5 ml 10 mM Tris/HCl Puffer, pH 7,5 aufgenommen. Die Konzentration und die Reinheit der DNA wurde photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt. Ein ΔA_{260} -Wert gleich 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg pro ml (SAMBROOK et al. 1989). Zusätzlich wurde die Qualität der DNA durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen überprüft.

Plasmid-DNA-Präparation

Plasmid-DNA wurde in kleinem Maßstab (3 ml-Kulturen) mit Hilfe des Spinprep-Kits oder im größeren Maßstab (25 ml-Kulturen) mit dem Midiprep Plasmid-Reinigungskit von Qiagen (Hilden) gereinigt. Die Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration und deren Reinheit erfolgte photometrisch bei 260 und 280 nm. Ein ΔA_{260} -Wert gleich 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg pro ml (SAMBROOK et al. 1989). Eine grobe Abschätzung der Konzentration von Plasmiden oder PCR-Produkten konnte auch durch visuellen Vergleich der Bandenintensitäten mit zirkulärer oder linearer Plasmid-DNA bekannter Konzentration im Agarose-Gel erreicht werden.

Präparation von Lambda-DNA

Lambda-DNA wurde mit Hilfe des „Lambda Starter Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Präparation von RNA

Gesamt-RNA aus *E. acidaminophilum* und *C. sticklandii* wurde mit Hilfe des „RNeasy Total RNA Kit“ (Qiagen, Hilden) isoliert. Pro Spinsäule wurde das Zellmaterial aus 10 ml-Kulturvolumen verwendet, das in der spätlogarithmischen Wachstumsphase geerntet wurde. Die Isolierung der RNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers, abweichend wurde eine stärker konzentrierte Lysozymlösung eingesetzt (20 mg/ml).

Reinigung von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte, die z. B. zur direkten Sequenzierung oder zur Klonierung eingesetzt werden sollten, wurden durch Benutzung des „QIAquick PCR Purification Kits“ (Qiagen, Hilden) gereinigt. Fragmentgemische wurden gelelektrophoretisch getrennt, die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die enthaltene DNA mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) aus dem Gel isoliert.

Restriktion von DNA

Die Restriktion der DNA erfolgte standardmäßig in einem Gesamtvolumen von 20 µl, das 1 µl Restriktionsenzym (1 – 20 U/µl) enthält. Die Inkubation erfolgte in den Restriktionspuffern nach Angabe des Herstellers für 1 – 3 Stunden.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Standard-Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von 1 – 2 %igen Agarosegelen (SAMBROOK et al. 1989) in TAE (Tris/Acetat/EDTA)-Puffer (40 mM Tris/Acetate, pH 8,0, 1 mM EDTA). Die Probe wurde vor dem Auftragen mit 0,3 Vol. Stopp-Lösung (50 % (v/v) Glycerin, 0,2 M EDTA, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Als Größenstandard kam der DNA-Marker „*Smart Ladder*“ (Eurogentec, Seraing, Belgien) zum Einsatz. War das Gel für einen Southern-Blot vorgesehen, wurde der DIG-markierte DNA-Längenstandard VII (Roche Biochemical Diagnostics, Mannheim) verwendet. Die Gele wurden in Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml in Wasser) gefärbt und nach kurzer Wässerung mit einem Videodokumentationssystem (TFX-20.M, MWG Biotech, München) fotografiert.

Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA

RNA-Proben wurden unter denaturierenden Bedingungen in einem 3 % Formaldehyd (37 % [v/v]) enthaltenden Agarosegel aufgetrennt. Zur späteren Abschätzung der Größe von Signalen wurde der DIG-markierte RNA-Längenstandard I (Roche Biochemical Diagnostics, Mannheim) mitgeführt.

Zur Probenvorbereitung wurden 6 µl RNA-Lösung mit 12,5 µl Formamid, 2,5 µl 10 × MOPS-Puffer (200 mM MOPS, pH 7,0, 50 mM Natrium-Acetat, 5 mM EDTA) sowie 4 µl Formaldehydlösung (37% [v/v]) versetzt, der Ansatz für 15 min bei 65 °C inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden 3 µl Probenpuffer (100 mM EDTA, 50 % [v/v] Glycerol, 0,1 % [w/v] SDS, 0,1 % [w/v] Bromphenolblau) sowie 1 µl Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) zugesetzt.

2.2.3 Transformation

Transformation von *E. coli*-Zellen durch Elektroporation

Elektrokompetente Zellen von *E. coli* XL 1 Blue MRF' wurden wie bei AUSUBEL et al. (1994) beschrieben hergestellt. Die Zellen wurden in einer 10 %igen Glycerinlösung resuspendiert und bei -70 °C bis zur Verwendung eingefroren. Unmittelbar vor der Transformation wurden 40-µl-Aliquots auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 1-10 µl DNA-Lösung in gekühlte Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand: 0,2 cm; Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) überführt. Nach 1 min Inkubation auf Eis erfolgte die Elektroporation durch einen einfachen Puls bei 25 µF, 2,5 kV, 200 Ω mittels Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Die dabei erreichte Feldstärke betrug 12,5 kV/cm, die Zeitkonstante 4,7 ms. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben, die Zellen bei 37 °C für 1 h schüttelnd inkubiert und 10 bzw. 100 µl des Ansatzes auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert.

Transformation von *E. acidaminophilum*-Zellen durch Elektroporation

Alle Schritte wurden in einer Anaeroben-Box (Forma Scientific, Inc., Marietta, USA) im Kühlraum durchgeführt. Alle benötigten Puffer und Geräte waren anaerob hergestellt bzw. behandelt und wurden vor Benutzung mindestens einen Tag in der Box gelagert.

Medium (50 ml) wurde mit einer frischen Übernachtskultur angeimpft, in der Anaeroben-Box bei 34 °C inkubiert und in der spätlogarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet. Das Pellet wurde zweimal mit Elektroporationspuffer (s. 3.6.5) gewaschen und anschließend entweder:

- in 2 ml Elektroporationspuffer aufgenommen; je 500 µl wurden in Elektroporationsküvetten mit 4 mm Elektrodenabstand (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) gegeben, mit ca. 0,5 µg Plasmid versetzt und mit einem Stromstoß behandelt; nach dem Stromstoß wurden die Zellen in Mini-

Hungates (Ochs, Bovenden) mit 2,5 ml Regenerationsmedium (Glycin-Medium für *E. acidaminophilum*) gegeben; oder:

- in 200 µl Elektroporationspuffer aufgenommen, je 50 µl wurden in Elektroporationsküvetten mit 2 mm Elektrodenabstand (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) gegeben, mit ca. 0,5 µg Plasmid versetzt und mit einem Stromstoß behandelt; nach dem Stromstoß wurden die Zellen in Mini-Hungates (Ochs, Bovenden) mit 950 µl Regenerationsmedium (meist Glycin-Medium) gegeben.

Die elektroporierten Zellen wurden zur Ausprägung der Resistenz mindestens drei Stunden bei 34 °C inkubiert und schließlich auf entsprechenden Selektionsmedien ausgestrichen. Zur Bestimmung der Überlebensrate während der Elektroporation wurden Proben direkt nach der Zugabe der Regenerationspuffers entnommen und je 100 µl einer 10⁻⁴-Verdünnung auf Medien ohne Antibiotika ausgestrichen. Zum Vergleich wurde eine Probe der nicht-elektroporierten Zellen herangezogen, die bis auf den Stromstoß exakt gleich behandelt wurde. Die Platten wurden in Wittschen Töpfen (Oxoid, Basingstoke, England) bei 30 °C inkubiert und nach 2 – 4 Tagen ausgewertet.

2.2.4 Übertragung von DNA durch Konjugation

Konjugation zwischen *E. coli* und *E. acidaminophilum*

Für Konjugationsexperimente erfolgte die Anzucht von *E. acidaminophilum* in 10 ml Glycin- (50 mM) oder SFG- (40/30/20 mM) Medium über Nacht. *E. coli* wurde in 5 ml LB-Medium aerob über Nacht angezogen und in ein Hungate-Röhrchen überführt. Beide Kulturen wurden 15 min bei 3.500 rpm sedimentiert und mit 5 ml des entsprechenden Mediums für *E. acidaminophilum* gewaschen und erneut sedimentiert. Anschließend wurden die Zellpellets in 200 µl SFG-Medium aufgenommen und in einem Hungate-Röhrchen vereinigt. In der Anaerobenbox wurde dieses „Mating“-Gemisch auf Filterplättchen (Celluloseacetat, 0,45 µm; Sartorius, Göttingen) aufgetropft. Neben dieser Methode mittels Zentrifugation wurden die Kulturen in der Anaerobenbox auch durch Filtrieren mittels Vakuumpumpe auf den Filter aufgebracht. Die Filter wurden bei 30 °C auf SFG-Agarplatten (in einigen Versuchen mit 0,2 % Glucose supplementiert) 24 h anaerob inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Glycin-Medium von dem Filter gewaschen. Von dem Konjugationsgemisch wurden 100 µl auf Glycin-Platten mit Tetracyclin (5 µg/ml) ausplattiert. Für die Zellzahlbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe in Glycin-Medium hergestellt, zur Bestimmung der Donorzellzahl auf LB-Medium (aerob, Inkubation bei 37 °C, über Nacht), zur Bestimmung der Rezipientenzellzahl auf Glycin-Platten ohne Antibiotikum (anaerobe Inkubation bei 30 °C über mindestens 3 Tage) ausplattiert.

Konjugation zwischen *E. faecalis* und *E. acidaminophilum*

Das „Mating“ bei Konjugationsexperimenten zwischen *E. faecalis* und *E. acidaminophilum* wurde durchgeführt wie für *E. coli* beschrieben. Die Zellanzucht des Donors erfolgte in 20 ml MRS-Medium wie in 2.1 beschrieben.

Die Filter wurden 24 h auf SFG-Platten anaerob inkubiert. Nach Abwaschen des „Mating“-Gemisches mit Glycin-Medium wurden 100 µl auf Glycin-Platten ausplattiert. Zur Bestimmung der Rezipientenzahl wurden entsprechende Verdünnungen ebenfalls auf Glycin-Medium ausplattiert (Inkubation anaerob bei 30 °C über mindestens 3 Tage), die Bestimmung der Donorzellzahl erfolgte durch Ausstreichen der Verdünnungen auf MRS-Platten (Inkubation aerob bei 37 °C über Nacht).

2.2.5 Herstellung einer Genbank von genomischer *E. acidaminophilum*-DNA

Eine λ -ZAPII-Genbank wurde unter Verwendung des Lambda ZAP II Predigested *EcoRI*/CIAP-Treated Vector Kits (Stratagene, Heidelberg) hergestellt. Genomische *E. acidaminophilum*-DNA wurde mit *EcoRI* vollständig verdaut und durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (10–40 % (w/v) Saccharose, 24 h, 200.000 x g) aufgetrennt. DNA-Fragmente im Bereich von 5 – 10 kb wurden in *EcoRI*-verdaute λ -Arme des λ -ZAPII-Vektors nach Angaben des Herstellers kloniert und in Phagenpartikel verpackt. Die Anzucht und Infektion der Wirtsorganismen, die Vermehrung und Lagerung der Phagen, sowie die *in vivo*-Excision von genomischer DNA tragenden Plasmiden aus positiven Phagen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zum qualitativen Nachweis bzw. zur quantitativen Anreicherung bestimmter DNA-Fragmente aus chromosomaler DNA oder rekombinanten Plasmiden wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genutzt.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler mit Deckelheizung (TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen) durchgeführt, die Oligonucleotide (Tabelle 3) wurden von Metabion (Martinsried) bezogen. Ein Reaktionsansatz von 100 µl enthielt folgende Komponenten: Reaktionspuffer (1 x, inklusive 5 mM MgCl₂), Primer (je 10 – 100 pmol), dNTPs (0,2 mM), Template-DNA (30-100 ng), DNA-Polymerase (1 U). Für Nachweis-PCRs wurde *Taq*-DNA-Polymerase verwendet, während für PCRs, deren Amplifikate für Klonierungen genutzt wurden, *PfuTurbo* DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt wurde, die eine “proof-reading”-Aktivität aufweist.

Tabelle 3: Übersicht über verwendete Primer. Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind hervorgehoben.

Primer	Sequenz in 5' →3'-Richtung	Verwendung
<i>fdh1</i>	AAR ATA GAY GGH AGA GAR CTW GAR GTD CCW AA	FDH-Sonde
<i>fdhCR</i>	CCC ATR TGR CAI GCD CCY TG	
<i>hyd-N1</i>	CTT CGG AGA CTA CAC TGG AG	Sonde gegen <i>hymC</i> ; semiquantitative RT-PCR: <i>hym</i> -Operon
<i>hyd-N2</i>	TGT AGT GAG TGT GAA GAA GC	
<i>hydA-5'</i>	CTC CAG TGT AGT CTC CGA AG	Klonierungsprimer
<i>hydA-3'</i>	CAG AAG GCT ACG AGG CAA TC	Klonierungsprimer
FAM- <i>fdh1</i> -PE	5'-FAM-TCT ATT CCA AGC TCC TTT GC	Primer Extension (stromaufwärts von <i>fdhB1</i>)
FAM- <i>mog</i> -PE	5'-FAM-CCT GCA TAG CCC TTG TCA C	Primer Extension (stromaufwärts von <i>mog</i>)
<i>fdh26</i>	AGG AAG TCT CAC CAC AAC GA	Nachweis eines gemeinsamen Transkripts von <i>hymC</i> und <i>hymD</i>
<i>orfM-N2</i>	ACA GAG AAT GCC AGG AAC G	
<i>fdh22</i>	CAT TTC GGT GCC CCT GTT TGC	semiquantitative RT-PCR: Gensatz I
<i>fdhB1-N2</i>	CTT GAA ATA GTG GCG TCC TGC	
<i>fdhB2-N1</i>	AAT CCC CGC TCT CTG CTA CG	semiquantitative RT-PCR: Gensatz II
<i>fdhB2-N2</i>	GTC TTC CGC TTG TAG GTG GC	
CsFDH2	GAC GGA ATA GTA AGC CCA AC	RT-PCR (<i>fdhA</i> , <i>C. sticklandii</i>)
CsFDH3	GGA CAA ACA CGA CTG AAT G	
CsFDH5	TTG CGG AAA CTA TGA TGC T	
CsFDH8	GGC TGA AAT CCC AAA CTA CA	RT-PCR (<i>aor/car</i> , <i>C. sticklandii</i>)
<i>fdhA1-NdeI</i>	GGA TTA CAT ATG GTG TTA GTC AAG ATA GAC GGC C	Expression von FdhA1 mittels IMPACT-System
<i>fdhA1-SalI</i>	TAT TCT GTC GAC TTT TAT ACG TTC TAT CCT CAC TGC GC	
M- <i>fdhA1-U/C-f</i>	CGC AAG GCT CTG TCA TGC TTC CAC TGT TGC	Mutationsprimer für FdhA1 (U/C)
M- <i>fdhA1-U/C-r</i>	GCA ACA GTG GAA GCA TGA CAG AGC CTT GCG	
<i>fdhB1-NdeI</i>	AGG GTT CAT ATG AAA AAA GTT AAT GTT GTA ATA GAC GG	Expression von FdhB1 mittels IMPACT-System
<i>fdhB1-XhoI</i>	AAA ACC CTC GAG TCT TTC TTC CAG CTT TTC TAT CCT G	
<i>fdhA1-BsaI-N</i>	TAA AGG GGT CTC TGC GCA TGG TGT TAG TCA AGA TAG AC	Expression von FdhA1 und dem N-terminal verkürzten ΔN-FdhA1 mittels <i>Strep</i> -tagII-System
<i>fdhA1-BsaI-ΔN</i>	AAC ACA GGT CTC GGC GCA TGA AAA AGG TCA GGA CAA CAT G	
<i>fdhA1-BsaI-C</i>	CTG ATT GGT CTC TTA TCA TTA TTT TAT ACG TTC TAT CCT CAC	
MLSA	AGA GGG TTA TAA TGA ACG AG	Primerpaar zum Nachweis von Vektoren mit MLS-Resistenz
MLSB	AAA TCG TCA ATT CCT GCA TG	
<i>ermBP1</i>	GAC GAA ACT GGC TAA AAT AAG	Nachweis von Vektoren mit <i>ermBP</i> -vermittelter Em ^R -Resistenz
<i>ermBP2</i>	TTT GGC GTA TTT CAT TGC TTG	
<i>catP1</i>	AAA CGG CAA ATG TGA AAT CC	Nachweis von Vektoren mit <i>catP</i> -vermittelter Cm ^R -Resistenz
<i>catP2</i>	ACT TGA ATT TGA GAG GGA AC	
<i>tetM-f</i>	CAA CGA GGA CGG ATA ATA CGC	Nachweis von Vektoren bzw. Transposons mit <i>tetM</i> -vermittelter Tc ^R -Resistenz
<i>tetM-r</i>	TGT TTG TAG TAG AGG GTG CGG	
<i>fdh32</i>	GCT CCC TAT CCT TAT GAC G	Primer für <i>anchored-ligation</i> -PCR zur Klonierung von <i>slpB</i>
<i>fdh38</i>	CAT AGG AGT CAT TGT AGC CA	
<i>slpA-1</i>	CTI ACI GAR GGI ATH GAR GA	Klonierungsprimer (<i>slpA</i>)
<i>slpA-2</i>	GGM CCW CTW ACW GAR GGM ATA GAR GA	
<i>fdh4</i>	ATC CGT ACC GCT TAT ATG CTG CG	Schnittstellenbestimmung von <i>EacI</i>
<i>fdh5</i>	GTG CGA AGA GCT GCA GGG GAC A	
CY5- <i>EacI-L</i>	CY5-CTG AGA CGA GAT ACA ACG ATG	
CY5- <i>EacI-R</i>	CY5-AGA CCT TCG CTT ATT ATT ACG	
<i>EacI-5</i>	TAG AGT GGG TGT TGT GGC GAG	Klonierungsprimer (<i>reacI</i>)
R/for1 Nt-fusion	TAT TAA GGT CTC GGC GCA TGG CTA TTT GGT ATA TTG GA	Expression von REacI mittels <i>Strep</i> -tagII-System (N-terminal)
R/rev Nt-fusion	GGA AAT GGT CTC ZZA TCA TAA GCA GAG TGA CAT ATT ACT	
M/for Nt-fusion	ATG AGG GGT CTC CGC GCA TGA GTA ATT CAC TGA AAA TC	Expression von MEacI mittels <i>Strep</i> -tagII-System (C-terminal)
M/rev Nt-fusion	AGC CAC GGT CTC ATA TCA TTA ATA TCC GAC AAA CAG ATA	
MEacI-f (pASK3)	AAT AAA GGT CTC TAA TGA GGG GGC GAC ATA TAT T	Coexpression von MEacI und REacI, REacI mit C-terminalem <i>Strep</i> -tag
REacI-r (pASK3)	AAT AAT GGT CTC TGC GCT GCA GAC TGA CAT ATT ACT AA	
<i>pfl-1</i>	AGR GGM AGR ATA ATA GGM GAY TA	Nachweis der Pyruvat-Formiat-Lyase in <i>E. acidaminophilum</i>
<i>pfl-2</i>	GAY GAY TAY GCM ATA GCM TGY TGY GT	
<i>pfl-2r</i>	ACR CAR CAK GCT ATK GCR TAR TCR TC	
<i>pfl-3r</i>	ACW GCR TAK CCW GAH ACY CTT ATW GT	
83 kDa-2	GAY CTK AGR AAR TTY CTK CAR GA	Klonierungsprimer
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	Universelle Primer zur Sequenzierung oder <i>anchored-ligation</i> -PCR
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	

Zur vollständigen Denaturierung der Template-DNA wurde der Ansatz 2 min auf 94 °C erhitzt. Gleichzeitig wurden dadurch unspezifische DNA-Primer-Hybridisierungen vermieden. Es wurden 30 Zyklen mit folgenden Schritten durchgeführt:

Denaturierung	30 s bei 94 °C
Primeranlagerung („Annealing“)	30 s bei 45 - 60 °C
Neustrangsynthese („Extension“)	1 - 4 min bei 72 °C

Abschließend wurde der Ansatz auf 4 °C gekühlt und die PCR-Produkte im Agarosegel analysiert, weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert. Die Temperatur bei der Primeranlagerung ist abhängig von dessen Länge und Nukleotidzusammensetzung. Sie wurde nach BERTRAM UND GASSEN (1991) so gewählt, dass sie etwa 5 °C unter der Primer-Schmelztemperatur (T_m) lag, die sich wie folgt berechnen lässt:

$$T_m = 2\text{ °C} \times \text{Anzahl der A/T-Paare} + 4\text{ °C} \times \text{Anzahl der G/C-Paare}$$

2.2.7 Hybridisierung

Die Hybridisierungen wurden mit dem DIG-Luminescent-Detection-Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Die Markierung der PCR-Sonden erfolgte mit dem DIG-DNA Labeling Kit, die Markierung von Oligonukleotiden mit dem DIG Oligonucleotide 3'-End Labelling Kit nach Angaben des Herstellers. Hybridisierung und Detektion erfolgten nach Angaben des Herstellers.

Die Hybridisierungstemperatur war abhängig von der Art der Sonde, homologe DNA-Sonden wurden bei 68 °C eingesetzt, heterologe bei 50 °C. Bei Verwendung von Oligonukleotid-Sonden wurde die Schmelztemperatur der Primer durch Verwendung der folgenden Formel berechnet:

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ G+C}) - (600/N)$$

Dabei ist $[\text{Na}^+]$ die Konzentration der Natrium-Ionen im letzten stringenten Waschschritt, % G+C bezieht sich auf den G+C-Gehalt des Primers und N entspricht der Anzahl der Basenpaare des Primers. Die Hybridisierung wurde 5 - 10 °C unter der Schmelztemperatur T_m durchgeführt.

Hybridisierungen von Northern-Blots wurden nach einem modifizierten Protokoll nach ENGLER-BLUM et al. (1993) in einem "high SDS" Hybridisierungspuffer (0,25 M Na_2HPO_4 , pH 7,2, 1 mM EDTA, 20 % SDS, 0,5 % Blocking Reagenz) über Nacht bei 68 °C durchgeführt. Vor der Detektion wurden die Membranen drei Mal 20 min mit 20 mM Na_2HPO_4 , pH 7,2, 1 mM EDTA, 1 % SDS bei 65 °C gewaschen.

Southern-Blots

Der Transfer der DNA aus dem Gel auf eine ungeladene Nylonmembran (Macherey-Nagel, Düren) erfolgte mittels Vakuum-Blot-Apparatur (Appligene-Oncor, Heidelberg) durch Anlegen eines Vakuums

(60 mbar) für 1-1,5 h. Vor dem Transfer wurde das Agarosegel mit der darin enthaltenen DNA 15 min in 0,25 N HCl schüttelnd inkubiert, um bei größeren DNA-Fragmenten Strangbrüche zu induzieren und damit deren Übertragung zu erleichtern. Anschließend erfolgten noch Inkubationen des Gels in Denaturierungs- (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl) und Neutralisierungslösung (3 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 7,5) für je 30 min. Eine Nylonmembran wurde auf Gelgröße zugeschnitten, kurz mit Wasser angefeuchtet und dann für 15 min in 20 x SSC (Standard-Saline-Citrat: 3 M NaCl, 0,3 M Natrium-Citrat) inkubiert. Nach dem Zusammenbau des Vakuum-Blots wurde das Gel mit 20 x SSC überschichtet und darauf geachtet, dass dies auch während des Transfers ständig der Fall war. Anschließend wurde die DNA durch je 2 min beidseitige UV-Bestrahlung auf der Nylonmembran fixiert.

Kolonie- und Plaque-Lifts

Vor dem Transfer der Kolonien bzw. Plaques auf Nylonmembranen (Macherey-Nagel, Düren) wurden die Agarplatten mindestens 30 min bei 4 °C vorgekühlt. Das Material wurde durch 1 minütiges Auflegen der Nylonmembranen auf die Agarplatte übertragen, wobei die Lage der Membran markiert wurde, um später auf positive Klone rückschließen zu können. Die Membranen wurden anschließend mit den Kolonien bzw. Plaques nach oben auf mit folgenden Lösungen getränkten Filterpapieren inkubiert: Denaturierungslösung (0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl, 0,1 % (w/v) SDS) 5 min, Neutralisierungslösung 15 min (s. o.) und 2 x SSC 10 min. Auch hier wurde die DNA mit UV-Licht auf der Membran fixiert. Wurden Kolonien auf Membranen übertragen, schloss sich eine Proteinase K-Behandlung an. Dazu wurden 500 µl Proteinase K-Lösung (2 mg/ml) auf eine Membran pipettiert, durch leichtes Schwenken verteilt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Zellreste wurden durch mit sterilem Wasser getränktes Filterpapier entfernt.

„Dot-Blots“

Für die Herstellung von „Dot-Blots“ wurden je 1 µl der DNA-Proben (DNA-Konzentration 1 µg/µl) mit 1 µl 2 M NaOH in einer Mikrotiterplatte gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben direkt auf eine Nylonmembran getropft und die DNA durch 2 min UV-Bestrahlung fixiert.

Northern-Blots

Der Transfer der in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen getrennten RNA auf eine ungeladene Nylonmembran (Macherey-Nagel, Düren) erfolgte mittels Vakuum-Blot-Apparatur (Appligene-Oncor, Heidelberg) durch Anlegen eines Vakuums (60 mbar) für 3 h. Vor dem Transfer wurde das Gel zur Entfernung überschüssigen Formaldehyds kurz in Wasser geschwenkt und analog wie für Southern-Blots beschrieben geblottet und fixiert.

2.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA (Plasmid-DNA und gereinigte PCR-Produkte) erfolgte durch Anwendung der von SANGER (1977) entwickelten Kettenabbruchmethode mittels "dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (PE Applied Biosystems, Langen). Die Analyse erfolgte mit Hilfe des automatisierten Laser-Fluoreszenz-Sequenzierers ABI PRISM 377 Version 4.0 (PE Applied Biosystems, Langen).

Zur Sequenzanalyse größerer Plasmide oder PCR-Produkte kamen vier verschiedene Methoden zur Anwendung:

- Subklonierung durch Restriktionsverdau des Plasmids mit passenden Restriktionsendonukleasen und Ligation der entstandenen Fragmente in pBluescript SK+;
- Subklonierung durch Einführung von „nested deletions“ mit Hilfe des Exo III/Mung Bean Nuclease Deletion Kits (Stratagene, Heidelberg) entsprechend der Anleitung des Herstellers;
- Herstellung von Transposonmutanten mit Hilfe des „Genome Priming Systems“ GPSTM-1 (New England BioLabs, Schwalbach/Taunus) nach Angaben des Herstellers;
- die Methode des „Primer Walking“.

Die ermittelten Sequenzdaten wurden mit den Computerprogrammen Clone 4 (Clone Manager-Version 4.0, Scientific & Educational Software, USA) und Dnasis (Version V5.00) ausgewertet. Die Bestimmung von offenen Leserahmen fand mit Hilfe des Internet-Programms ORF-Finder von National Center for Biotechnological Information (NCBI) statt. Sequenzhomologien zu den in den Datenbanken EMBL und SWISS-PROT enthaltenen DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem vom NCBI bereitgestellten Internet-Programm Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ermittelt. Sequenzvergleiche von Proteinen wurden mit dem Internet-Programm ClustalW vom European Biotechnology Institute (EBI) erstellt. Die Bestimmung von Sequenzmotiven in Proteinsequenzen und die Errechnung von Proteinmolekulargewichten anhand der Aminosäure-Sequenzen erfolgte mit den Internet-Programmen Scan Prosite, Profile Scan und Compute pI/Mw des Expasy Molecular Biology Server (Institut für Bioinformatik, Genf, Schweiz).

2.2.9 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch „primer extension“

5'-Enden von mRNA wurde durch Kombination der Fragment-Längenbestimmung mit einer abgewandelten „primer extension“-Methode (BOORSTEIN UND CRAIG 1989) bestimmt.

Für die Reaktion wurden in einem Volumen von 12 µl ca. 2 µg Gesamt-RNA mit 1 pmol des 6-FAM-markierten Primers gemischt, 10 min bei 70 °C und 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 4 µl 5 × First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 20 mM dNTPs zugesetzt und der Reaktionsansatz zur Primeranlagerung bei 48 – 50 °C inkubiert. Nach 2 min wurde die reverse Transkription durch Zugabe von 0,7 µl SUPERSRIPT™ II (200 U/µl; Gibco BRL/Life Technologies GmbH, Eggenstein) gestartet und 1 h bei gleicher Temperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C abgestoppt und die cDNA durch Zugabe von 2 µl 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2) und 60 µl Ethanol gefällt. Das nach Zentrifugation (14.000 rpm, 20 °C, 20 min) gebildete Pellet wurde mit 80 % Ethanol gewaschen und getrocknet.

Vor der Analyse durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese, durchgeführt am ABI PRISM 377 (PE Applied Biosystems, Langen), wurde das Pellet in „loading buffer“ aufgenommen und denaturiert. Die Länge der cDNAs wurde mit Hilfe des internen GeneScan-500 (ROX) Größenstandards (PE Applied Biosystems, Langen) bestimmt, der den Ansätzen beigefügt wurde. Die Auswertung der Fragmentlängen-Analysen erfolgte mit GENESCAN 2.1-Software.

2.2.10 RT-PCR

Zur Entfernung kontaminierender DNA wurde 1 µg RNA mit 1 U “RQ1 RNase-free DNase” (Promega, Mannheim, Germany) in einem Volumen von 10 µl bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die DNase wurde durch Zugabe von “RQ1 DNase Stop Solution” und 10 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Die DNA-Freiheit wurde durch eine geeignete PCR überprüft.

Die reverse Transkription wurde wie für die “primer extension“-Analyse beschrieben durchgeführt, außer dass 1 µl DNA-freie RNA und 1 µl Hexanukleotid-Mix (3 A₂₆₀ units/ml, Roche Diagnostics, Mannheim) anstelle eines spezifischen Primers eingesetzt wurden. Zur Gewährleistung der Anlagerung der Hexanukleotide wurde der Ansatz 10 min bei Raumtemperatur statt bei 50 °C inkubiert. In einer nachfolgenden PCR wurde 1 µl der RT-Reaktion oder ihrer Verdünnungen eingesetzt.

2.2.11 Einführung einer Punktmutation mittels *overlap-extension-PCR*

Zum Austausch des Selenocysteins gegen Cystein in FdhA1 wurde die Methode der *overlap-extension-PCR* angewendet. Von der zu mutierenden Region wurden die beiden Primer M-*fdhA1-U/C-f* und M-*fdhA1-U/C-r* abgeleitet, die in ihrer Mitte den Basenaustausch tragen. In einer ersten PCR wurde zunächst M-*fdhA1-U/C-r* mit dem N-terminalen Primer *fdhA1-NdeI* und M-*fdhA1-U/C-f* mit dem C-terminalen *fdhA1-SalI* kombiniert, die aus chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* amplifizierten Produkte wurden mittels Qiaquick PCR Purification-Säulen gereinigt und mit *DpnI* verdaut, um Verunreinigungen durch chromosomaler DNA in der zweiten PCR zu verhindern. *DpnI* schneidet in der Erkennungssequenz GATC nur dann, wenn A methyliert ist; in der *fdhA1*-Sequenz befinden sich drei *EacI*-Schnittstellen (GGATC), die in der chromosomalen DNA von *E. acidaminophilum* sehr wahrscheinlich ebenfalls am A methyliert vorliegen. Anschließend wurden die beiden *DpnI*-behandelten PCR-Produkte durch Gel-Extraktion gereinigt und dienten als Template in einer zweiten PCR, in der nur die beiden N- und C-terminalen Primer *fdhA1-NdeI* und *fdhA1-SalI* eingesetzt wurden. Das entstandene PCR-Produkt, das die erwartete Größe aufwies, wurde durch Extraktion aus dem Gel gereinigt, mit *NdeI* und *SalI* geschnitten und in den *NdeI-XhoI*-geschnittenen pTYB2-Vektor ligiert. Alle durch Sequenzierung überprüften Klone wiesen den Basenaustausch auf.

2.3 Allgemeine biochemische Methoden

2.3.1 Entsalzen und Einengen von Proteinlösungen

Entsalzen mit PD-10 Säulen

Kleinere Proteinmengen wurden mit PD-10-Säulen (Amersham-Pharmacia, Freiburg) entsalzt. Diese wurden vorher mit 25 ml des gewünschten Puffers äquilibriert. Anschließend wurden 2,5 ml Probe aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 3,5 ml Puffer.

Dialyse von Proteinlösungen

Zum Entsalzen von Proteinlösungen wurde in Dialyse-Schläuchen (Visking, Serva, Heidelberg) unter ständigem Rühren für zwei bis vier Stunden bei 4 °C unter einmaligem Pufferwechsel gegen das 50- bis 1000-fache Volumen dialysiert. Die Schläuche wurden zuvor in H₂O dest. für 10 min ausgekocht und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Einengen von Proteinlösungen im Dialyseschlauch

Proteinlösungen in größeren Volumina wurden im Dialyseschlauch auf PEG 20000 eingeeengt. Die Proteinlösung wurde hierzu in einen Dialyseschlauch gefüllt und in einer Schale vollständig mit PEG 20000 bedeckt. Die Konzentrierung erfolgte bei 4 °C.

Einengen von Proteinlösungen mit Microcon-Röhrchen

Die Konzentrierung von Proteinlösungen kleinerer Volumina erfolgte in Microcon-10-Röhrchen (Fa. Millipore, Eschborn), die eine Ausschlussgrenze von 10 kDa aufweisen. Die Konzentrierung erfolgte durch Zentrifugieren bei 4 °C und 6.000 rpm nach Angaben des Herstellers.

2.4 Methoden zur Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase

2.4.1 Bestimmung der Formiat-Dehydrogenase-Aktivität

Während der Aufreinigung der Formiat-Dehydrogenase wurde die Aktivität durch die Oxidation von Formiat (WAGNER UND ANDREESEN 1977, mod.) bestimmt.

Messung der Formiat-Dehydrogenase-Aktivität in Glasküvetten

Der Enzymtest wurde unter strikt anaeroben Bedingungen in Halbmikroglasküvetten (d=1 cm, Ochs Labortechnik, Bovenden), die nach dem Einfüllen von Testpuffer, Benzylviologen und anschließender Begasung mit Stickstoff mit Naturkautschuk-Septen (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) verschlossen wurden. Die Reduktion von Benzylviologen wurde bei 578 nm an einem UV-1202-Photometer (Shimadzu, Jena) mit „Kinetik“-Programmkarte verfolgt.

Testansatz:	Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 8,0)	920	µl
	Benzylviologen (0,25 M) ¹	20	µl
	Natrium-Dithionit (50 mM) ¹	2 - 3	µl
	Enzymprobe	0,25 - 5	µl
	Formiat (0,4 M) ¹	50	µl

¹ Die Lösungen wurden in abgekochtem Testpuffer angesetzt. In den Messungen zum Vergleich der spezifischen Aktivität von Formiat-Oxidation und CO₂-Reduktion wurden 15 µl einer 0,4 M-Stammlösung Methylviologen eingesetzt.

Die Anfangsextinktion wurde mit Natrium-Dithionit auf ca. 0,3 eingestellt, um Restsauerstoff aus der Küvette zu entfernen. Der Enzymtest wurde bei 34 °C durchgeführt. Der Ansatz wurde bis zu 2 min ohne

Substrat bei 34 °C inkubiert, um die Blindreaktion abklingen zu lassen. Anschließend wurde die Blindreaktion gemessen; nach Substratzugabe erfolgte die Messung der Reaktion (20 s je Messung). Aus der durch das Programm berechneten Extinktionsänderung pro Minute konnte die Volumenaktivität der Probe berechnet werden:

$$A_v = \frac{\Delta E / \text{min} \cdot V_T}{d \cdot \epsilon \cdot v_P}$$

A_v = Volumenaktivität [U/ml] (1 U entspricht Umsatz von 1 μmol Substrat pro min)

$\Delta E/\text{min}$ = Extinktionsänderung pro Minute [min^{-1}]

d = Schichtdicke [cm]

ϵ = Extinktionskoeffizient [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]

ϵ_{578} (Benzylviologen) = 8,3 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

ϵ_{600} (Methylviologen) = 13,1 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

V_T = Volumen des Testansatzes [ml]

v_P = Volumen der Probe [ml]

Bei der Berechnung ist zu beachten, dass Benzyl- und Methylviologen Einelektronenüberträger sind, d. h. zwei Viologen-Moleküle pro umgesetztes Formiat-Molekül reduziert werden.

Messung der Formiat-Dehydrogenase-Aktivität mittels Mikrotiterplattentest

Zur schnelleren Detektion von Enzymaktivitäten während der Aufreinigung konnte der Enzymtest auch in Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Während der ersten Anreicherung wurde Methylenblau als Elektronenakzeptor verwendet, während der zweiten Benzylviologen. Eine in die Anaerobenbox eingeschleuste Mikrotiterplatte wurde vorbereitet, indem jeweils 150 μl Testmix (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,2 mM Methylenblau/5 mM Benzylviologen, 20 mM Formiat) vorgelegt wurden. Zur Bestimmung der Blindreaktion diente ein zweiter Testmix ohne Substrat. Von jeder zweiten bis fünften Fraktion wurden 1 - 5 μl Probe in Testmix mit und ohne Substrat pipettiert. Anschließend wurden die Fraktionen ausgewählt, die am schnellsten zu einer Entfärbung des Ansatzes führten. Die Quantifizierung erfolgte danach im Küvettentest.

Bestimmung der Aktivität der Formiat-Dehydrogenase als CO_2 -Reduktase

Die allgemeinen Bedingungen waren analog der Aktivitätsmessung durch Formiat-Oxidation. Zum Nachweis der CO_2 -Reduktase-Aktivität der Formiat-Dehydrogenase wurde der folgende Ansatz gewählt:

Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 8,0)	860	μl
Methylviologen (10 mM)	15	μl
DTT (0,5 M)	20	μl

Der Testansatz wurde 5 min inkubiert, anschließend wurden die folgenden Reagenzien zugefügt:

Natrium-Dithionit (50 mM) ¹	2 - 3	μl
NaHCO_3 (0,3 M in 0,3 M KP, pH 7,2)	100	μl
Enzymprobe	1 - 5	μl

Die Dithionitzugabe wurde so gewählt, dass sich durch das reduzierte Methylviologen eine Extinktion von ca. 1 ergab. Nach Messung der Blindreaktion nach Zugabe von Dithionit und Substrat, wurde die Reaktion durch die Zugabe des Enzyms gestartet und die Abnahme der Extinktion bei 578 nm verfolgt. Die Tests wurden mit der MonoQ-Fraktion 30 durchgeführt, pro μl waren ca. 0,1 U FDH-II enthalten (durch Formiat-Oxidation mit Methylviologen als Elektronenakzeptor bestimmt). Einige Tests wurden in Gegenwart von 10 μl Carboanhydrase-Lösung (50 U/ μl) durchgeführt.

2.4.2 Voraussetzungen für die Anreicherung Sauerstoff-empfindlicher Proteine

Alle im folgenden beschriebenen Methoden zur Aufreinigung der Formiat-Dehydrogenase aus *E. acidaminophilum* mussten unter strikt anaeroben Bedingungen erfolgen. Dazu wurden alle Schritte in einer Anaeroben-Box (Coy Laboratories Inc., Vertrieb durch Toepffer, Adelberg) unter einer Formiergasatmosphäre (5 % H_2 / 95 % N_2) bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle verwendeten Puffer wurden ausgekocht und unter Stickstoffbegasung abgekühlt und anschließend in Schraubverschlussflaschen (Müller und Krempel, Zürich, Schweiz) mit Latex-Gummisepten (Maag, Dübendorf) abgefüllt. Fraktionen, die während der Anreicherung aus der Anaeroben-Box ausgeschleust werden mussten, wurden vorher in Hungate-Röhrchen oder Serumflaschen mit Septen überführt. Alle Geräte und Kunststoffgefäße wurden mindestens einen Tag vor der Benutzung in die Anaeroben-Box eingeschleust. Falls eine Lagerung von Fraktionen über Nacht oder mehrere Tage notwendig war, wurden diese bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

2.4.3 Puffer für die Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase

Soweit nicht anders erwähnt, wurden für die Anreicherung stets die folgenden Puffer verwendet:

Puffer A:	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM Natrium-Azid 2 mM DTT 2 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0,1 $\mu\text{g/l}$ Resazurin
Puffer B:	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM Natrium-Azid 2 mM DTT 0,1 $\mu\text{g/l}$ Resazurin
Puffer C:	Puffer A mit 1 M NaCl

2.4.4 Fällungen

Ammoniumsulfat-Fällung

Die fraktionierte Fällung erfolgte mit Hilfe einer bei 4 °C gesättigten Ammoniumsulfatlösung. Dazu wurde 4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in Puffer A eingewogen, wobei sich das Ammoniumsulfat nicht vollständig löste. Der pH-Wert dieser Lösung wurde auf 8,0 eingestellt. Die Lösung wurde vor ihrer Verwendung mindestens 1 h gerührt, um Sättigung zu erreichen. Mit dieser Lösung wurde durch tropfenweise Zugabe die gewünschten Konzentrationen in der Probe eingestellt. Die Berechnung erfolgte in % (v/v), was ungefähr mit % Sättigung übereinstimmen müsste. Die Probe wurde anschließend 30 min gerührt und danach zentrifugiert. Die fraktionierte Fällung der ersten Anreicherung wurde bei 4 °C, die der zweiten bei Raumtemperatur durchgeführt.

Hitze-fällung

Für die Vortests wurde der zuvor auf Eis gelagerte Rohextrakt (0,5 ml) in Hungate-Röhrchen im Wasserbad 3 bzw. 10 min bei 50 - 70 °C schüttelnd inkubiert und anschließend sofort in Eiswasser abgekühlt. Ausgefallenes Protein wurde durch Zentrifugation der Hungate-Röhrchen in der Eppendorf-Zentrifuge bei 3.500 rpm, 4 °C, 10 min pelletiert. Anschließend wurde die FDH-Aktivität im Überstand bestimmt. Während der zweiten Anreicherung wurde eine Hitze-fällung bei 60 °C für 10 min durchgeführt. Der Rohextrakt wurde auf Hungate-Röhrchen verteilt (10 ml pro Röhrchen) und vor und nach der Hitze-einwirkung auf Eis inkubiert. Das denaturierte Protein wurde durch Zentrifugation abgetrennt, die Röhrchen wurden 20 min bei 4 °C bei 3.500 rpm (Hermle Z323K, Hermle Labortechnik, Wehingen) zentrifugiert und in die Anaerobenbox geschleust. Die Überstände wurden vereinigt und noch einmal bei 20.000 rpm in SS34-Röhrchen zentrifugiert.

2.4.5 Säulenchromatographie

Abgesehen von den Vorversuchen wurden alle säulenchromatographischen Schritte an einer FPLC-Anlage, bestehend aus Pumpe P-500, der UV-Einheit Optical Unit UV1 und einem Fraktionssammler FRAC-100 mit angeschlossenem Schreiber REC 101 (alles Amersham-Pharmacia, Freiburg) in einer Anaerobenbox bei Raumtemperatur durchgeführt.

Vorversuche

Um die Bindungsfähigkeit der Formiat-Dehydrogenase an unterschiedlichen Säulenmaterialien zu testen, wurden verschiedene Probesäulen mit einem Bettvolumen von 1-2 ml verwendet. Die verwendeten Materialien wurden entsprechend den Herstellerangaben reaktiviert und gelagert und sind in Tabelle 4 auf-

gelistet. Als Extrakt von *E. acidaminophilum* diente die Fraktion von 0-60 % der Ammoniumsulfat-Fällung.

Tabelle 4: Säulenmaterialien für Vorversuche

Gelmaterial	Äquilibriumspuffer	Elutionspuffer
Phenyl-Sepharose ¹	1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ in Puffer A	Puffer A
Hexyl- Sepharose ²		
Octyl- Sepharose ²		
Decyl- Sepharose ²		
Docecyl-Sepharose ²		
Reactive Red ²	Puffer A	Puffer C
Reactive Blue 4 ²		
Reactive Blue 72 ²		
Reactive Brown 10 ²		
Cibacron Blue ²		

¹ Amersham-Pharmacia, Freiburg

² Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase

Für die Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase wurden folgende chromatographischen Schritte durchgeführt:

- Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose Fast Flow
- Hydrophobe Interaktions-Chromatographie an Octyl-Sepharose
- Anionenaustauschchromatographie an MonoQ HR5/5
- Gelfiltration an einer Superdex 200 HR 10/30 Fertigsäule (nur bei der 1. Anreicherung)

Alle Materialien bzw. Säulen waren von Amersham-Pharmacia (Freiburg) und wurden nach Angaben des Herstellers benutzt und regeneriert. Zur ausführlicheren Beschreibung der Anreicherung s. 3.4.

2.5 Methoden zur Anreicherung der Restriktionsendonuklease *EacI*

2.5.1 Restriktionsendonuklease-Assay nach SCHLEIF (1980)

Mit Hilfe des Assays können Restriktionsendonukleasen relativ einfach nachgewiesen werden. Dieser Test basiert auf einer Dextran-Polyethylenglycol-Phasentrennung, wobei durch Variation des Salzgehalts die verunreinigenden Nucleasen im Rohextrakt von sequenzspezifischen Nucleasen getrennt werden können.

3 g Zellen von *E. acidaminophilum* wurden in 10 ml Puffer (10 mM Tris, pH 7,9, 10 mM β -Mercaptoethanol) aufgenommen und mittels Ultraschall aufgeschlossen (10 s 80 % Leistung, 20 s Pause; 30 min). Zur Herstellung des Polymerkonzentrates wurden 6,4 g Dextran T500 in 50 ml heißem Wasser gelöst, 25,6 g PEG 6000 zugesetzt und durch Zugabe von Wasser auf ein Gewicht von 90 g gebracht. Das Konzentrat wurde zur Lösung aller Bestandteile vor der Benutzung auf 65 °C erwärmt und auf 20 °C abgekühlt.

Die in ihrer Salzkonzentration variierenden Ansätze hatten folgende Zusammensetzung:

1 ml aufgeschlossene Zellen
0,5 ml H₂O
0,55 g Polymerkonzentrat
2 / 5 / 10 / 20 / 40 / 80 / 170 / 320 / 640 / 1200 μ l 4 M NaCl

Die Ansätze wurden in Reagenzgläser gegeben, mit einem Rührschwein versehen und 5 min gerührt. Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation bei 5.000 x g für 10 min getrennt und die Nuclease-Aktivität des wässrigen Überstands durch 2-stündige Inkubation bei 37 °C von je 2 μ l Überstand mit 2 μ l λ -DNA und 16 μ l Puffer (6 mM Tris-HCl, pH 7,4, 6 mM β -Mercaptoethanol, 6 mM MgCl₂) getestet. Die Restriktionsansätze wurden anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.5.2 Bestimmung der *EacI*-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität der Restriktionsendonuklease *EacI* aus *E. acidaminophilum* erfolgte qualitativ über den Verdau von unmethylierter Lambda-DNA (Appligene-Oncor, Heidelberg). Zu einem Volumen von 18 μ l [2 μ l 10 x Reaktions-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT), 2 μ l BSA (1 mg/ml) und 1 μ l Lambda-DNA (500 ng) ad 18 μ l] wurden 2 μ l Proteinprobe gege-

ben, 1 h bei 37 °C inkubiert und die Restriktion der Lambda-DNA anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.5.3 Puffer für die Anreicherung von *EacI*

Soweit nicht anders erwähnt, wurden für die Anreicherung stets folgende Puffer verwendet:

Puffer D: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
0,1 mM EDTA
1 mM DTT

Puffer E: Puffer D mit 100 mM NaCl

2.5.4 Anreicherung von *EacI*

Die Restriktionsendonuklease *EacI* aus *E. acidaminophilum* wurde aus Zellen isoliert, die in Glycin-Medium gewachsen waren. Die Zellen wurden nach Lysozym-Behandlung mittels French-Press aufgeschlossen. Die Anreicherung erfolgte aerob bei 4 °C. Für die Darstellung von *EacI* wurden folgende Anreicherungs-schritte durchgeführt:

- Ammoniumsulfatfällung
- Affinitätschromatographie an DNA-Cellulose im *batch*-Verfahren
- Affinitätschromatographie an Heparin-Agarose
- Anionenaustauschchromatographie an MonoQ HR5/5
- Gelfiltration an einer Superdex 200 HR 10/30-Säule

Die Ammoniumsulfatfällung wurde wie unter 2.4.4 beschrieben, aber aerob durchgeführt. Die Affinitätschromatographie an DNA-Cellulose erfolgte im *batch*-Verfahren, indem das Material nach guter Durchmischung mit dem entsprechenden Puffer und Inkubation auf Eis durch Zentrifugation bei 2.000 x g für 3 min sedimentiert wurde.

Die Affinitätschromatographie an Heparin-Agarose erfolgte an einer HiLoad-Anlage mit Pumpe P1, UV-Detektionseinheit Uvicord SII und Fraktionssammler Redi Frac mit angeschlossenen Schreiber REC 101, die Chromatographie an MonoQ sowie die Gelfiltration wurden an einer FPLC-Anlage, bestehend aus

Pumpe P-500, UV-Einheit Optical Unit UV1 und Fraktionssammler FRAC-100 mit angeschlossenem Schreiber REC 101 durchgeführt (alles Amersham-Pharmacia, Freiburg). Alle Materialien bzw. Säulen waren ebenfalls von Amersham-Pharmacia (Freiburg) und wurden nach Angaben des Herstellers benutzt und regeneriert. Zur ausführlicheren Beschreibung der Anreicherung s. 3.7.2.

2.6 Anreicherung des Surface-Layer-Proteins

Die Anreicherung des S-Layer-Proteins von *E. acidaminophilum* erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von MESSNER UND SLEYTR (1988).

5 g tiefgefrorene Glycin- bzw. Serin/Formiat/Sarkosin (10/50/50 mM)-Zellen wurden in 50 ml Tris-HCl (50 mM, pH 7,2) resuspendiert. Die Zellen wurden mittels French-Press (ohne vorherige Lysozym-Behandlung) aufgeschlossen. Diese Suspension wurde durch Zentrifugation fraktioniert. Durch eine erste, niedertourige Zentrifugation (10 min, 5.000 rpm) wurden nicht aufgeschlossene Zellen abgetrennt, in einer zweiten Zentrifugation (15 min, 18.000 rpm, SS34-Rotor, 4 °C) wurden die Zelltrümmer sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zur Solubilisierung der Membranen und Membranproteine in 15 ml 0,5 % [v/v] Triton X-100 in 50 mM Tris-HCl, pH 7,2 resuspendiert und 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (18.000 rpm, 4 °C, 15 min). Das Pellet wurde einmal mit 0,5 % [v/v] Triton X-100 in 50 mM Tris-HCl, pH 7,2 und sechsmal mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,2 gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Das Pellet mit den Zellwandfragmenten wurde zur Dissoziation der S-Layer-Proteine in 10 Volumina 5 M Guanidiniumhydrochlorid in 50 mM Tris-HCl, pH 7,2 resuspendiert und 2 h gerührt. Das Peptidoglycan wurde durch Zentrifugation bei 20.000 rpm bei 4 °C für 20 min sedimentiert. Der Überstand mit den gelösten S-Layer-Proteinen wurde gegen Wasser bei 4 °C für 24 h dialysiert. Nach der Dialyse wurde erneut zentrifugiert (20.000 rpm, 4 °C, 20 min). Das Pellet sollte die reassozierten S-Layer-Proteine enthalten, im Überstand verblieben nicht reassozierte Proteine.

Die Anreicherung der S-Layer-Proteine wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nachgewiesen.

2.7 Überexpression von Proteinen

2.7.1 Herstellung rekombinanter Proteine mit dem IMPACT[®]-System

Die Reinigung von Proteinen über das IMPACT[™] T7:One-Step Protein Purification System (New England BioLabs GmbH, Schwalbach/Taunus) beruht auf der Überexpression eines Fusionsproteins aus Target und Intein mit Chitin-Binde-Domäne. Dieses Protein kann an eine Chitinsäule binden, während andere Proteine durch Waschschrte von der Säule entfernt werden. Durch Zugabe von DTT und Inkubation über Nacht bei 4°C wird in einem *self-cleavage*-Prozess das Target-Protein vom Intein abgespalten und kann von der Säule eluiert werden, während das Intein mit Chitin-Binde-Domäne am Säulenmaterial verbleibt. Die Regeneration der Säule erfolgt mittels SDS (10 g/l).

Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte

Für die Überexpression eines Proteins wurde zunächst dessen codierendes Gen in den Expressionsvektor pTYB2 nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der *Nde*I- und *Xho*I-Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle kloniert. Die Plasmidkonstrukte wurden in die Expressionsstämme *E. coli* ER2566 bzw. *E. coli* BL21-pUBS520 transformiert. Die Hauptkulturen (50 ml) in LB-Medium zur Überexpression wurden direkt mit frischem Material einer Einzelkolonie angeimpft und bei 30°C schüttelnd bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert. Danach erfolgte die Induktion der T7-Polymerase durch Zugabe von 0,3 mM IPTG. Nach drei Stunden wurden die Zellen geerntet und in 5 ml (pro 50 ml Kultur) Säulenpuffer [50 mM Tris/HCl, pH 7,8, 0,5 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100] resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (GM 60 HD Uni Equip Laborgerätebau, Martinsried) 10 x in 20 s-Impulsen bei maximaler Leistung (60 W) unter dauerhafter Kühlung aufgeschlossen und zur Abtrennung der Zelltrümmer 30 min bei 20.000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Überstand und Pellet wurden getrennt voneinander durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse auf Vorhandensein des gewünschten Proteins untersucht.

Proteinnachweis durch Doppelimmunpräzipitation (nach BLAKE et al., 1984)

Mittels Doppelimmunpräzipitation lassen sich Fusionsproteine mit Chitin-Bindedomäne nachweisen. Die zu untersuchenden Proteinproben wurden mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen (s. 2.8.3) und zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer [PBS-Puffer (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl) mit 5 % „Glücksklee“-Magermilchpulver] inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 3 x 5 min mit PBS-Tween [PBS-Puffer mit 0,1 % (v/v) Tween 20] gewaschen. Danach wurde die Membran in PBS-Tween mit dem gegen die Chitin-Bindedomäne gerichteten 1. Antikörper (Anti-CBS-Antikörper aus Kaninchen, 1:5.000 verdünnt; New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) für 1 h inkubiert. Es folgten 3 x 15 min Waschen der Membran in PBS-Tween und 1 x 5 min in PBS-Puffer, um ungebundenen Antikörper zu

entfernen. Darauf wurde die Membran mit einem Anti-IgG-Antikörper (monoklonaler Anti-Kaninchen-Antikörper aus Maus, Peroxidase-gekoppelt; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) für 1 h inkubiert, der 1:50.000 in PBS-Tween verdünnt zum Einsatz kam. Den darauf folgenden Waschschritten (3 x 15 min in PBS-Tween und 1 x 5 min in PBS-Puffer) schloss sich der Nachweis der gebildeten Immunkomplexe an. Bei der Nachweisreaktion wurden auf die PVDF-Membran gleichzeitig je 15 ml Detektionslösung I [1,5 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,5 und 8 µl H₂O₂ ad 15 ml H₂O dest.] und Detektionslösung II [1,5 ml 1 M Tris/HCl pH 8,5, 168 µl 250 mM Luminol (gelöst in DMSO), 66 µl 30 mM p-Cumarsäure (gelöst in DMSO) ad 15 ml H₂O dest.] gegeben, durch Schwenken gemischt und 1 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionslösung abgegossen, die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und auf einem Röntgenfilm (Lumifilm, Chemoluminescent Detection Film, Roche Diagnostics, Mannheim) 30 s bis 2 min exponiert.

2.7.2 Herstellung rekombinanter Proteine mit dem *Strep-tag*[®]-System

Klonierung, Zellanzucht und Induktion

Für die Überexpression eines Proteins wurde zunächst dessen codierendes Gen in den Expressionsvektor pASK-IBA 3 oder pASK-IBA 7 (IBA, Göttingen) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der *Bsa*I-Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle kloniert. Das durch Sequenzierung überprüfte Plasmid wurde in die Expressionsstämme *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL oder BL21 pUBS520 transformiert. Zur Expression der Proteine wurden 25 ml LB-Medium mit einer Kolonie des gewünschten Stammes angeimpft, bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert und mit 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin (AHT; IBA, Göttingen) induziert. Nach drei Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und mittels French-Press aufgeschlossen. Lösliche und unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (20.000 x g, 4 °C, 30 min) voneinander getrennt und durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse auf Vorhandensein des gewünschten Proteins untersucht. Der Nachweis des *Strep-tag* II Fusionsproteins erfolgte mit Hilfe des *Strep-tag* Detection-Kit (IBA, Göttingen) nach Angaben des Herstellers.

Affinitätschromatographie an StrepTactin-Sepharose

Zur Reinigung der löslich exprimierten *Strep-tag*II-Fusionsproteine wurden die entsprechenden Rohextrakte auf StrepTactin-Säulen gegeben (Bettvolumen 1 ml; IBA, Göttingen; in Einwegsäulen, Qiagen, Hilden). Die Säule wurde mit 3 x 1 ml Puffer W (100 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA) gewaschen und das Protein mit 8 x 0,5 ml Puffer E (Puffer W mit 2,5 mM Desthiobiotin) eluiert. Zur Regeneration wurde die Säule mit 3 x 5 ml Puffer R (Puffer W mit 1 mM 4-Hydroxyazobenzol-2-carboxylsäure) und 2 x 4 ml Puffer W gespült.

Unlöslich in *inclusion bodies* exprimiertes Protein wurde mit 8 M Harnstoff in Puffer W denaturiert, durch Dialyse gegen Puffer W bei 4 °C renaturiert und nach Zentrifugation (20.000 x g, 4 °C, 30 min) wie oben geschrieben über StrepTactin gereinigt.

2.8 Analytische Methoden

2.8.1 Proteinbestimmung durch Färbung mit Coomassie Blue

Zur Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) wurden bis zu 20 µl Probe mit 1 ml BRADFORD-Reagenz in einer 1-ml-Plastikküvette gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 595 nm gegen einen Leerwert ohne Probe im Spektralphotometer (UV 1202, Fa. Shimadzu, Jena). Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve ermittelt.

Bradford-Reagenz:

Ethanol 96 % (v/v)	50	ml
Serva Blau G 250	70	mg
H ₃ PO ₄ 85 % (v/v)	100	ml
H ₂ O dest.	ad 1000	ml

Der Farbstoff wurde erst vollständig in Ethanol gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe der anderen Komponenten. Die Lösung wurde über einen Faltenfilter gegeben und in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.8.2 Protein-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in einfachen oder Twin-Minigel-Kammern der Fa. Biometra (Göttingen) nach LAEMMLI (1970) durchgeführt. Dabei kamen 10 oder 12 %ige Trenngele zum Einsatz (Tabelle 5).

Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit einem Drittel Volumenanteil Proben-Puffer (125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 10 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau) versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Als Elektrodenpuffer diente ein Tris-Glycin-Puffer (10 x Elektrodenpuffer: 30,3 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS; pH 8,8). Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 25 mA pro Gel. Der Lauf wurde beendet, sobald die Lauffront das

untere Trenngelende erreicht hatte. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde der „Protein Marker Broad Range“ (2-212 kDa) verwendet, sollte das Gel anschließend geblottet werden, wurde zusätzlich der „Prestained Protein Marker Broad Range“ (6-175 kDa) aufgetragen (beide New England Biolabs, Schwalbach/Taunus).

Tabelle 5: Zusammensetzung der SDS-Gele

	Trenngel (10 %)		Trenngel (12 %)		Sammelgel (5 %)	
Acrylamid-Lösung (40%) ¹	1,5	ml	1,8	ml	0,188	ml
Trenngel-Puffer ²	0,75	ml	0,75	ml	-	
Sammelgel-Puffer ³			-		0,5	ml
SDS (10%)	60	µl	60	µl	20	µl
H ₂ O dest.	3,09	ml	3,39	ml	1,292	ml
APS-Lösung (10 % w/v)	40	µl	40	µl	13,3	µl
TEMED	5	µl	5	µl	1,7	µl

¹ Rotiphorese Gel 40: 38,6 % (w/v) Acrylamid, 1,33 % (w/v) Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)

² Trenngel-Puffer: 3 M Tris/HCl, pH 8,8

³ Sammelgel-Puffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

Die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels Färbung mit Coomassie-Blue (WEBER UND OSBORN 1969, mod.) sichtbar gemacht. Das Gel wurde mindestens 30 min leicht schwenkend in Coomassie-Färbelösung [2 g Coomassie Brilliantblau R-250, 0,5 g Coomassie Brilliantblau G-250, 425 ml Ethanol, 50 ml Methanol, 100 ml Essigsäure, ad 1 l H₂O dest.] inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes innerhalb von 1-2 h durch Entfärberlösung [30 % Methanol, 10 % Essigsäure]. Die Gele wurden bis zur Trocknung in H₂O dest. aufbewahrt. Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden luftblasenfrei zwischen zwei zurechtgeschnittene, befeuchtete Cellophan-Folien (Biometra, Göttingen) gelegt und mittels eines Gelrockners (Gel Slab Drier GSD-4, Destainer Power Supply DPS, Amersham-Pharmacia, Freiburg) unter Anlegen eines Vakuums und einer Heizleistung von 24 W für 90 min getrocknet.

2.8.3 Transfer von Proteinen mittels Western-Blot

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz oder dem Nachweis von Proteinen mittels Antikörpern wurden Proteine aus ungefärbten SDS-Polyacrylamidgelen mit Hilfe einer Semidry-Elektroblot-

Apparatur (Biometra, Göttingen) auf Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membranen (Immobilon-P Transfer-Membran, Millipore, Eschwege) transferiert.

Die Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und für jeweils 1 min in Methanol, H₂O dest. und Transfer-Puffer (50 mM Natriumborat, pH 9,0, 20 % (v/v) Methanol; ECKERSKORN et al. 1988) geschwenkt. Auch auf Gelgröße wurden 6 Lagen Whatman-3MM-Chromatographie-Papier zugeschnitten und mit Transferpuffer getränkt. Das Gel wurde nach Entnahme aus der Elektrophoresekammer zur Entfernung beim Transfer störender Salze ebenfalls im Transferpuffer geschwenkt. In der Blotapparatur wurden 3 Lagen Whatman-Papier, die Membran, das Proteingel und noch einmal 3 Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei übereinandergelegt und Strom angelegt. Der Elektrotransfer der Proteine auf die Membran erfolgte im Kühlraum bei konstanter Stromstärke (1 mA/cm² Gelfläche) für eine Stunde. Nach dem Transfer wurde das Gel zur Kontrolle der Bloteffizienz mit Coomassie gefärbt.

2.8.4 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Proteinproben zur N-terminalen Aminosäuresequenzierung wurden mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen (s. 2.8.3). Die Proteine wurden durch Inkubation in 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, gelöst in 50 % (v/v) Methanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure für 2 min gefärbt. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Hintergrundes mit 50 % (v/v) Methanol und 7,5 % (v/v) Essigsäure. Die Banden des zu sequenzierenden Polypeptids wurden aus der PVDF-Membran herausgeschnitten. Die Sequenzierung durch automatischen Edman-Abbau unter Verwendung des Sequenzanalyse-Systems 476A oder Procise 492cLC (beide PE Applied Biosystems, Weiterstadt) wurde von Dr. K. P. Rücknagel, Forschungsstelle der Max-Planck-Gesellschaft, Halle, durchgeführt.

2.8.5 Bestimmung von W, Mo, Fe und Se

Die Bestimmung von Wolfram, Molybdän, Eisen und Selen wurde durch Frau Dr. D. Alber im Neutronenaktivierungsanalyse-Labor (NAAL) am Hahn-Meitner-Institut Berlin durchgeführt.

Als Probe wurden 400 µl der oxidierten Formiat-Dehydrogenase nach der Aufnahme des UV-VIS-Spektrums (ca. 0,13 mg Protein entsprechend ca. 0,5 nmol $\alpha\beta\gamma_2$ -Protomer) sowie der Laufpuffer der Gelfiltration (versetzt mit 20 mM Formiat) als Blindwert für die Messung zur Verfügung gestellt.

2.8.6 Nachweis des Pterin-Cofaktors

Die Bestimmung des Pterin-Cofaktors erfolgte wie bei MECKENSTOCK et al. (1999) durch Umsetzung des Cofaktors zu Pterin-6-Carbonsäure. Dazu wurden 400 µl der zu untersuchenden Probe auf 50 µl eingengt und mit 200 µl KMnO₄ (55 mM) in 0,1 M NaOH für 15 min auf dem Wasserbad gekocht. Anschließend wurden die Proteinbestandteile mit 500 µl Ethanol ausgefällt und 15 min bei 15.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde im Fluoreszenzspektrometer SFM 25 (Kontron Instruments, Watford, UK) analysiert. Für die Messung der Emission wurde bei 380 nm angeregt, die Messung des Anregungsspektrums erfolgte bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Als Standard zur Quantifizierung diente Pterin-6-Carbonsäure.

2.8.7 Nachweis der Schnittstelle von *EacI*

Um die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *EacI* zu bestimmen, wurde ein "primer extension" vergleichbarer Ansatz gewählt. Ein durch Verwendung eines 5'-markierten Primers markiertes PCR-Produkt wurde mit *EacI* verdaut und anschließend parallel mit einer Sequenzreaktion, die mit dem gleichen markierten Primer durchgeführt wurde, auf einem Sequenzgel analysiert. Durch Fluoreszenzmarkierung des *sense*- bzw. *antisense*-Stranges kann man mit dieser Methode ermitteln, wo und mit welchem Überhang das Enzym sein Substrat relativ zu seiner Erkennungssequenz schneidet.

Mit den Primerpaaren CY5-*EacI*-R und *fdh5* bzw. CY5-*EacI*-L und *fdh4* wurden zwei PCR-Produkte hergestellt, die die gleiche *EacI*-Erkennungsstelle einschlossen und von denen jeweils ein Strang eine Markierung trug. Je 5 µl beider PCR-Produkte wurden mit *EacI* und als Kontrolle mit *AlwI*, das die gleiche Erkennungsstelle wie *EacI* besitzt, in einem Volumen von 20 µl komplett verdaut. Je 2 µl der entstandenen Fragmente wurden, einer klassischen "primer extension"-Reaktion entsprechend, parallel mit der dazugehörigen Sequenzreaktion auf einem Sequenzgel des automatisierten Laser-Fluoreszenz-Sequenzierers A.L.F.TM (Amersham-Pharmacia, Freiburg) analysiert. Die Sequenzreaktion wurde unter Verwendung des "SequiTherm EXCELTM II Long-ReadTM Premix DNA Sequencing Kit-A.L.F.TM" (Bioszym Diagnostik, Hess. Oldendorf) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Template diente mit dem Primerpaar *fdh4* und *fdh5* gewonnenes und gereinigtes PCR-Produkt, als Primer für die Sequenzierung kamen CY5-*EacI*-L bzw. CY5-*EacI*-R zur Anwendung.

2.9 Materialien, Chemikalien und Enzyme

Soweit nachfolgend nicht extra aufgeführt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Fluka Chemie AG (Heidelberg), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) in handelsüblichem Reinheitsgrad bezogen. Restriktionsendonukleasen stammen von den Firmen Appligene-Oncor (Heidelberg) und Roche Biochemical Diagnostics (Mannheim). Stickstoff (4.0), Formiergas (95 % Stickstoff/5 % Wasserstoff) und Wasserstoff (3.0) wurde von Messer Griesheim geliefert. Darüber hinaus wurden Materialien, Chemikalien und Enzyme folgender Firmen eingesetzt:

Appligene-Oncor, Heidelberg: Lambda-DNA

Amersham-Pharmacia, Freiburg: Q-Sepharose Fast Flow, Octyl-Sepharose, MonoQ HR5/5, Superdex 200 HR 10/30 Säule, Heparin-Sepharose CL-6B

Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf: SequiTherm EXCEL™ II Long-Read™ Premix DNA Sequencing Kit-A.L.F.™, Elektroporationsküvetten

Eurogentec, Seraing, Belgien: Smart Ladder (DNA-Größenstandard)

Gibco BRL/Life Technologies GmbH, Eggenstein: Primer

Macherey-Nagel, Düren: Nylonmembranen

Millipore GmbH, Eschborn: Membranfilter, PVDF-Membranen, Microcon-10-Röhrchen

Metabion GmbH, Martinsried: Primer

New England BioLabs, Schwalbach/Taunus: GPS™-1 (Genome Priming System), Protein-Größenstandards, IMPACT™ T7:One-Step Protein Purification System, Anti-CBS-Antikörper, *AlwI*

Qiagen, Hilden: QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, Plasmid Mini Kit, RNeasy Total RNA Kit, Lambda Starter Kit

PE Applied Biosystems, Weiterstadt: DNA Sequencing Kit (dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction), GeneScan-500 (ROX) Größenstandard

Promega, Mannheim: RQ1 RNase-free DNase, pGEM-T-easy-Vektor

Roche Biochemical Diagnostics, Mannheim: DIG DNA Labelling Kit, DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids, DIG Oligonucleotide 3'-End Labelling Kit, Lumi-Film Chemoluminescent Detection Film, DIG-DNA-Längenstandard VII, DIG-RNA-Längenstandard I, T4 DNA Ligase, SAP (Shrimps Alkalische Phosphatase), DNase I

Stratagene GmbH, Heidelberg: Lambda ZAP II Predigested *EcoRI*/CIAP-Treated Vector Kit, Exo III/Mung Bean Nuclease Deletion Kit, *PfuTurbo* DNA-Polymerase, *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, *E. coli* SCS110, pBluescript SK+

3 Experimente und Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beleuchtet verschiedene Aspekte des Stoffwechsels von *E. acidaminophilum*. Im Vordergrund der Untersuchungen stand dabei die Formiat-Dehydrogenase. Die Darstellung der Experimente und Ergebnisse gliedert sich in mehrere Teile. Zunächst wird die Klonierung sowie die Expression der Gene der Formiat-Dehydrogenasen aus *E. acidaminophilum* und *C. sticklandii* vorgestellt. In den darauf folgenden Kapiteln wird die Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase aus *E. acidaminophilum* beschrieben, sowie die Überexpression der Formiat-Dehydrogenase in *E. coli*. Abschließend werden die Versuche vorgestellt, die zum Aufbau eines Transformationssystems für *E. acidaminophilum* durchgeführt wurden.

3.1 Molekulare Analyse der Formiat-Dehydrogenase aus *E. acidaminophilum*

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Klonierung und Sequenzierung der zwei Formiat-Dehydrogenasen und einer Eisen-Hydrogenase aus *E. acidaminophilum*. Desweiteren wurde die Expression dieser Gene auf der Ebene der Transkription untersucht.

3.1.1 Klonierung und Sequenzierung der *fdh*-Gene

Die Formiat-Dehydrogenase aus *E. acidaminophilum* war bereits von GRANDERATH (1993) partiell gereinigt und die katalytische Untereinheit als ein Polypeptid mit der relativen Masse von 95 kDa beschrieben worden. Die N-terminale Sequenz war durch Edman-Abbau bestimmt worden.

Sowohl von dieser als auch von einem konservierten internen Bereich, der durch Alignment verschiedener Formiat-Dehydrogenase-Sequenzen identifiziert wurde (NVQGACMG, Aminosäuren 555-563 bei *M. thermoacetica*, Acc. Nr. U73807), wurden degenerierte Primer abgeleitet (*fdh1* bzw. *fdhCR*). Mittels Polymerase-Kettenreaktion mit chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* als Template wurde ein ca. 1,7 kb großes PCR-Produkt amplifiziert. Dieses wurde nach Klonierung in den pGEM-T-easy-Vektor sequenziert, wobei die N-terminale Sequenz des 95 kDa-Proteins wiedergefunden werden konnte, außerdem zeigte die Sequenz hohe Homologien zu katalytischen Untereinheiten anderer Formiat-Dehydrogenasen.

Das PCR-Produkt wurde mit Digoxigenin markiert und als Sonde eingesetzt, um eine λ -ZAP II-Cosmidbank sowie eine pUC18-Plasmidbank von *E. acidaminophilum* zu durchsuchen. Positive Klone wurden durch Plaque- bzw. Koloniehybridisierung identifiziert. Es konnten zunächst drei Klone aus der Plasmidbank mit Insertgrößen von ca. 1,2 kb (pFDH1/2), 3,1 kb (pFDH1/1) und 3,7 kb (pFDH2/1), sowie zwei Klone mit Insertgrößen von 7,2 kb (pFDH2/2) und 8,1 kb (pFDH2/3) aus der Cosmidbank iso-

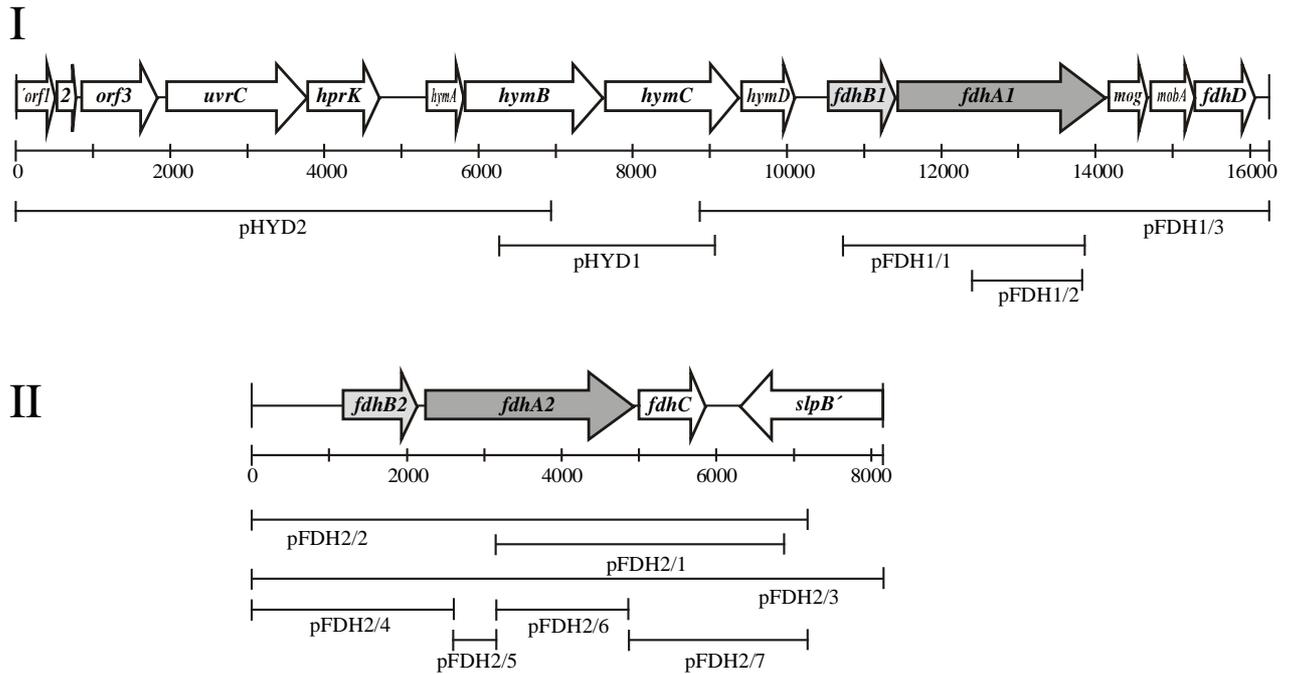


Abb. 3.1: Übersicht über die klonierten Sequenzbereiche der *fdh*-Genregionen in *E. acidaminophilum*. I Genzusatz I der Formiat-Dehydrogenase und *hym*-Operon; II Genzusatz II der Formiat-Dehydrogenase.

liert werden (Abb. 3.1). Sowohl pFDH1/1 als auch pFDH2/1 enthalten das in Analogie zu den entsprechenden Genen anderer Mikroorganismen als *fdhA* bezeichnete Gen für die α -Untereinheit der Formiat-Dehydrogenase. Da diese Genabschnitte untereinander nicht identisch waren, war davon auszugehen, daß im Genom von *E. acidaminophilum* zwei Kopien des *fdhA*-Gens (*fdhA1* und *fdhA2*) vorkommen.

Das mit 8,1 kb größte Insert von pFDH2/3 wurde subkloniert und die daraus resultierenden Plasmide (pFDH2/4 bis pFDH2/7) mit Insertgrößen von 0,5, 1,7, 2,5 und 2,8 kb wurden ebenso wie die anderen gefundenen Plasmide sequenziert. Dabei zeigte sich, daß pFDH1/2 vollständig in pFDH1/1 und pFDH2/2 und pFDH2/1 in pFDH2/3 enthalten waren.

Die von dem *fdhA1*-Gen abgeleitete Aminosäuresequenz stimmt mit dem N-Terminus des von GRANDERATH isolierten 95 kDa-Proteins überein. Der C-Terminus von FdhA1 war auf pFDH1/1 nicht enthalten, weswegen ein Anschlussklon gesucht wurde. Da dieser in den vorhandenen Genbanken nicht gefunden werden konnte, wurde eine partielle λ -ZAP II-Cosmidbank angelegt, die vollständig verdaute *EcoRI*-Fragmente der Größe 5 bis 10 kb enthielt. Durch Southern-Blot-Untersuchungen war festgestellt worden, dass sich das *fdhA1*-Gen auf einem ca. 7,5 kb *EcoRI*-Fragment befand (Daten nicht gezeigt). Durch Plaquehybridisierungen als positiv erkannte Phagen wurden einer *in vivo* Excision unterzogen, doch trotz verschiedenster Abänderungen der Durchführung konnten keine Plasmide mit Insert erhalten werden. Auch die Größe der positiven Plaques (maximal 0,5 mm im Vergleich zu normal 2 bis 3 mm) deutete darauf hin, dass das gesuchte Insert ein Gen enthielt, dessen Genprodukt für den Wirtsorganis-

mus *E. coli* toxisch ist. Mit den entsprechenden Phagenextrakten als Template in einer PCR konnte eindeutig bestätigt werden, dass das Phagengenom das *fdhA1*-Gen beinhaltet. Daher wurde Phagen-DNA isoliert, um diese direkt zu sequenzieren. Hierbei zeigte sich, dass ein Großteil der Phagen kein Insert mehr trug, da durch Spaltung mit *EcoRI* kein Fragment mehr herausgeschnitten werden konnte. Da das Insert über PCR aber nach wie vor nachgeweisbar war, wurden die unbekanntenen Bereiche des Inserts mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden zwei aus der Sequenz von pFDH1/1 (dessen Insert komplett in dem gesuchten Fragment enthalten ist) hinausweisende Primer mit den universellen T3- und T7-Primern kombiniert. Die erhaltenen ca. 2,5 bzw. 3,5 kb großen Fragmente wurden direkt per *primer walking* sequenziert. Das komplette *EcoRI*-Fragment (7,4 kb), wenngleich nie als Plasmid erhalten, wird im weiteren Verlauf wegen des besseren Verständnisses mit pFDH1/3 bezeichnet.

Die erhaltenen Sequenzen der beiden Gensätze sind im Anhang zusammen mit den abgeleiteten Proteinsequenzen wiedergegeben.

3.1.2 Analyse der *fdh*-Gensätze

Die Anordnung der Gene von pFDH1/3 und pFDH2/3 ist in Abb. 3.1 gezeigt. Diese wurden weitestgehend aufgrund ihrer jeweils abgeleiteten Aminosäuresequenz und deren Homologie-Vergleich mit Einträgen aus Datenbanken identifiziert.

Beide Gensätze enthalten das die katalytische Untereinheit der Formiat-Dehydrogenase codierende Gen *fdhA* (*fdhA1* und *fdhA2*). Die Gene weisen 68 % Identität auf DNA-Ebene sowie 66,6 % Identität auf Proteinebene auf. FdhA1 bzw. FdhA2 werden in 3.1.3 ausführlich analysiert. Stromaufwärts beider *fdhA*-Gene befindet sich ein offener Leserahmen *fdhB1* bzw. *fdhB2*, der für ein 311 bzw. 317 Aminosäuren umfassendes Protein codiert. Die Gene bzw. abgeleiteten Proteine weisen sowohl hohe Identitäten zueinander auf (60,7 % Identität auf DNA-Ebene; 50,8 % Identität auf Proteinebene) als auch zu den N-terminalen Bereichen der FdhA-Proteine (FdhA1-FdhB1: 42,0 % Identität; FdhA2-FdhB2: 44,5 % Identität).

Weitere offene Leserahmen wurden im 5'- und 3'- flankierenden Bereich der *fdhBA*-Gene identifiziert. Im Gensatz I wurde am 5'-Ende des Inserts ein Gen (*hymC*) gefunden, dessen Genprodukt Homologien sowohl zu monomeren Eisen-Hydrogenasen aus *Clostridium perfringens* (KAJI et al. 1999) und *Clostridium acetobutylicum* (SANTANGELO et al. 1995) aufwies als auch zu Eisen-Hydrogenasen, die aus mehreren Untereinheiten bestehen, wie die Hydrogenase aus *Desulfovibrio fructosovorans* (MALKI et al. 1995). Da zeitgleich eine trimere Eisen-Hydrogenase aus *E. acidaminophilum* kloniert wurde (KEIL 1999), wurde die stromaufwärts des *fdh*-Operons gelegene Hydrogenase zur Klärung der Frage, um welche Art es sich bei der neu identifizierten handelt, vollständig kloniert (s. 3.1.4). Direkt stromabwärts des *hymC* genannten Gens wurde mit *hymD* ein offener Leserahmen identifiziert. Bei Datenbankvergleichen konnten keine signifikanten Homologien festgestellt werden. Hydropathie-Plots zeigten, dass es sich bei HymD vermutlich um ein Membranprotein mit sechs Membrandurchgängen handelt (s. 3.1.5, Abb. 3.4).

Stromabwärts von *fdhA1* wurden zwei Gene identifiziert, deren Genprodukte Homologien zu Mog und MobA aufweisen, die an der Synthese des Molybdopterin-Cofaktors beteiligt sind. Da *mog* nur 39 bp stromabwärts von dem die Wolfram-abhängige Formiat-Dehydrogenase codierenden *fdhA1* lokalisiert ist, könnte dies darauf hindeuten, dass diese Gene an der Biosynthese des Wolfram-Pterin-Cofaktors beteiligt sind. Eine gemeinsame Transkription der *fdh*-Gene mit *mog*, *mobA* und *fdhD* konnte durch Northern-Blot-Analysen nachgewiesen werden (s. 3.1.8). Mit einer Überlappung von 23 bp schließt sich *fdhD* an *mobA* an. Die Funktion von FdhD ist noch nicht eindeutig geklärt, bei *E. coli* ist es für die Aktivität von FDH-H und FDH-N notwendig. Nach Insertion einer Kanamycin-Kassette war keine FDH-N-Aktivität mehr messbar, die Aktivität von FDH-H betrug nur noch 25 % (STEWART et al. 1991).

In Gensatz II wurde stromabwärts von *fdhA2* ein offener Leserahmen identifiziert, dessen Genprodukt FdhC Homologien zu den Formiat-Carrier-Proteinen FocA von *E. coli* (SUPPMANN UND SAWERS 1994) sowie FdhC von *Methanobacterium formicicum* (WHITE UND FERRY 1992) und *Methanobacterium thermoformicum* (NÖLLING UND REEVE 1997) aufweist. Für FdhC von *E. acidaminophilum* können wie für FocA sechs transmembrane Helices postuliert werden. Für FocA wurde die Membrantopologie durch *in vivo* TnphoA-Mutagenese bestätigt (SUPPMANN UND SAWERS 1994).

Stromabwärts von *fdhC* wurde in gegensätzlicher Transkriptionsrichtung ein offener Leserahmen identifiziert, dessen 5'-Ende nicht auf pFDH2/3 enthalten war. Dieser Leserahmen codiert für ein Protein mit mindestens 604 Aminosäuren, Datenbankvergleiche erbrachten schwache Homologien zu Surface-layer-Proteinen bzw. Exoproteinen. Aus Gründen, auf die in 3.6.6.2 näher eingegangen wird, wurde dieses Protein SlpB genannt.

3.1.3 Sequenzanalyse der Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenasen aus *E. acidaminophilum*

Sowohl FdhA1 (893 AS, 98,0 kDa, pI 5,77) als auch FdhA2 (897 AS, 98,0 kDa, pI: 5,70) enthalten Selenocystein, das durch ein *in-frame* TGA-Codon codiert wird. Selen-enhaltende Formiat-Dehydrogenasen sind auch aus *E. coli* (FdhF: ZINONI et al. 1986; FdnG: BERG et al. 1991, BLATTNER et al. 1997; FdoG: PLUNKETT et al. 1993, BLATTNER et al. 1997) und *M. thermoacetica* (YAMAMOTO et al. 1983) bekannt. Auch die putativen Formiat-Dehydrogenasen von *Campylobacter jejuni* (PARKHILL et al. 2000) und *Aquifex aeolicus* (DECKERT et al. 1998), die den trimeren Enzymen FDH-N und FDH-O von *E. coli* ähneln, enthalten im codierenden Gen ein TGA-Codon an der entsprechenden Position. Bei den anderen verwandten Formiat-Dehydrogenasen befindet sich anstelle des Selenocysteins ein Cystein.

FdhA1 und FdhA2 zeigen die höchsten Homologien zu den katalytischen Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenasen thermophiler Prokaryonten wie dem acetogenen Bakterium *M. thermoacetica* (51,3 % Identität mit FdhA1, 51,2 % Identität mit FdhA2; Acc. Nr. U73807) sowie den Archaea *M. formicicum** (49,2 %/48,1 %; SHUBER et al. 1986) und *M. thermoformicum** (54,0 %/52,7 %; NÖLLING UND REEVE

1997). Geringere, aber immer noch deutliche Homologien zeigen sie zu den α -Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenasen von *R. eutropha* (40,5/40,2 %; OH UND BOWIEN 1998) und FDH-H von *E. coli** (40,1 %/ 40,3 %; ZINONI et al. 1986). Nur geringe Ähnlichkeiten werden beim Vergleich mit den heterotrimeren Formiat-Dehydrogenasen von *E. coli* (FDH-N und FDH-O, BLATTNER et al. 1997), *Wolinella succinogenes* (BOKRANZ et al. 1991) und den putativen Formiat-Dehydrogenasen gleichen Aufbaus von *C. jejuni* (PARKHILL et al. 2000) und *A. aeolicus* (DECKERT et al. 1998) deutlich. Diese letztgenannten Formiat-Dehydrogenasen besitzen zusätzlich zu der katalytischen α -Untereinheit und der elektronen-transportierenden β -Untereinheit, die Eisen-Schwefel-Zentren aufweist, eine weitere γ -Untereinheit, ein membranintegrales Cytochrom. Durch Verknüpfung mit respiratorischer Nitrat-Reduktase oder Sulfat-Reduktase sind diese Formiat-Dehydrogenasen an der Energiekonservierung beteiligt.

Die katalytischen Untereinheiten der dimeren Formiat-Dehydrogenasen aus *E. acidaminophilum*, *M. thermoacetica*, die Enzyme der Archaea, der tetrameren S-FDH von *R. eutropha* und FdhF von *E. coli* kann man in zwei Gruppen unterteilen: Gruppe I mit dem Prototyp FdsA von *R. eutropha*, FdhA von *M. thermoacetica*, FdhA1 und FdhA2 von *E. acidaminophilum*, sowie Gruppe II mit den übrigen Proteinen. Wie durch einen schematischen Vergleich der beiden Typklassen gezeigt (Abb. 3.2), unterscheiden sich Gruppe I- von Gruppe II-Proteinen durch ca. 220 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus. In diesem Bereich befinden sich konservierte Motive für die Bildung von vier Eisen-Schwefel-Zentren (C1-C4). In Cluster C2 ist vermutlich ein hochkonserviertes Histidin am Aufbau des Eisen-Schwefel-Zentrums beteiligt (OH UND BOWIEN 1998). Alle katalytischen Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenasen dieser zwei Gruppen weisen in der ihnen gemeinsamen Sequenz sieben weitere Motive auf: C5 (Eisen-Schwefel-Cluster), F1 und F2 (in Formiat-Dehydrogenasen konservierte Bereiche; das Selenocystein - sofern vorhanden - befindet sich in F1), M1 und M2 (auch in anderen Molybdopterin-enthaltenen Proteinen konserviert), sowie O1, O2 und O3 (auch in anderen nicht Molybdopterin-enthaltenden Oxidoreduktasen wie NuoG konserviert). Die Motive wurden von OH UND BOWIEN (1998) durch multiple Alignments identifiziert.

FdhA1 und FdhA2 gliedern sich gut in Gruppe I ein. Die Untereinheiten FdhB1 und FdhB2, die stromaufwärts der *fdhA*-Gene codiert werden, unterscheiden sich deutlich von den elektronentransferierenden Untereinheiten der anderen Formiat-Dehydrogenasen aus Gruppe I. Wie bereits in 3.1.2 angedeutet, weisen FdhB1 und FdhB2 hohe Ähnlichkeiten zu dem N-terminalen Teil der FdhA-Proteine auf, wobei die am Aufbau der Motive C1-C5 beteiligten Cysteine (bzw. das Histidin) konserviert sind. Daher besitzen möglicherweise auch diese Proteine je fünf Eisen-Schwefel-Zentren (Abb. 3.2). Die Vermutung liegt nahe, dass die FdhB-Proteine an der Elektronenübertragung von oder auf die katalytische Untereinheit der Formiat-Dehydrogenase beteiligt sind. Bei der partiellen Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase (GRANDERATH 1993) wurde kein 35 kDa-Protein mit der katalytischen Untereinheit angereichert. Die Bestätigung, dass FdhB eine Untereinheit der aktiven Formiat-Dehydrogenase ist, wurde durch die Rei-

* Identität berechnet auf die tatsächliche Länge des Alignments

nigung der FDH-II erhalten (s. 3.4). Anlass zu Spekulationen gibt die Frage, warum die Formiat-Dehydrogenasen aus *E. acidaminophilum* im Vergleich zu denen anderer Organismen über derartig viele Eisen-Schwefel-Zentren verfügen.

Auch die Formiat-Dehydrogenasen von *M. thermoacetica* und *R. eutropha* enthalten neben der katalytischen Untereinheit mit fünf postulierten Eisen-Schwefel-Zentren noch eine zusätzliche elektronentransportierende Untereinheit, die weitere Eisen-Schwefel-Cluster enthält. Diese Untereinheiten weisen abgesehen von den Cystein-reichen Motiven keine Homologien zueinander auf, was darauf hindeutet, dass diese Proteine die Verbindung zum Stoffwechsel herstellen, der sich bei den drei Organismen stark unterscheidet.

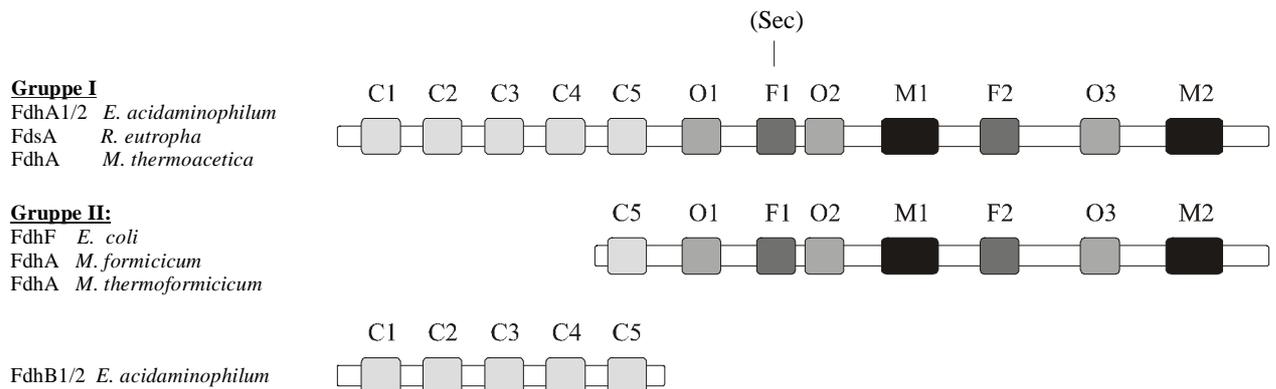


Abb. 3.2: Domänenstruktur der katalytischen Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenasen nach OH UND BOWIEN (1998). Erklärungen der Domänen im Text.

3.1.4 Klonierung einer Eisen-Hydrogenase

Southern Blot-Untersuchungen mit einer aus *hymC* abgeleiteten Sonde (mit dem Primerpaar *hyd-N1* und *hyd-N2* amplifiziert) zeigten, dass sich der Großteil der Hydrogenase-Gensequenz auf einem 2,7 kb-*PstI*-Fragment befand, von dem nur ca 200 bp am 3'-Ende durch den Klon pFDH1/3 bekannt waren. Aus einem Saccharose-Dichtegradienten wurden *PstI*-Fragmente von ca. 2,5 bis 3 kb isoliert und in den Vektor pBSK+ ligiert. Dieser Ligationsansatz diente als Template für eine PCR mit dem Hydrogenase-spezifischen Primer *hydA-5'*, der stromaufwärts der ersten *PstI*-Schnittstelle von pFDH1/3 bindet, in Kombination mit den Vektor-spezifischen Primern T3 und T7. Es wurde ein ca 2,7 kb-großes Produkt amplifiziert und in den pGEM-T-easy-Vektor kloniert. Das Insert des resultierenden Plasmides pHYD1 wurde mit universellen Primern sequenziert, wobei sich zeigte, dass es sich um das gesuchte Fragment handelte, die Hydrogenase neben HymC noch mindestens eine weitere Untereinheit besitzt, die noch nicht vollständig auf diesem Fragment enthalten war (Abb. 3.1). Daher wurde aus der neu erhaltenen Sequenz ein weiterer Primer abgeleitet (*hydA-3'*), der DIG-markiert direkt zur Hybridisierung der λ -ZAP II-Phagenbank eingesetzt wurde. Mit pHYD2 konnte ein Plasmid mit einer Insertgröße von 6,9 kb iso-

liert werden, das den noch fehlenden Bereich der Hydrogenase enthielt. Allerdings stellt dieses Plasmid nicht den direkten Anschlußklon zu pFDH1-3 dar (Abb. 3.1). Der fehlende Bereich zwischen pHYD2 und pFDH1/3 wurde direkt als PCR-Produkt sequenziert.

3.1.5 Analyse der Hydrogenase-Genregion

Anhand von Sequenzhomologien der abgeleiteten Proteine konnten drei Gene (*hymABC*) als zur Hydrogenase gehörend identifiziert werden. Eine gemeinsame Transkription mit *hymD* konnte nachgewiesen werden (s. 3.1.8), so dass das Operon aus vier Genen besteht (Abb. 3.3). Da mit HymD ein Membranprotein vorliegt, wurden die Gene dieser Hydrogenase mit *hymABCD* (*hym* = Hydrogenase, membrangebunden) benannt. Von der zweiten aus *E. acidaminophilum* bekannten Eisen-Hydrogenase (*hnd*-Operon; KEIL 1999) unterscheidet sich das *hym*-Operon durch *hymD*, zu dem kein homologes Gen im *hnd*-Operon gefunden wurde. Die Untereinheiten der beiden Eisen-Hydrogenasen weisen zueinander keine signifikant höheren Homologien auf als zu den entsprechenden Untereinheiten von Eisen-Hydrogenasen anderer Organismen (HymA/HndA 38,6 % Identität, HymB/HndC 47,7 % Identität und HymC/HndD 60,7% Identität).

HymC (578 AS, 63,8 kDa, pI 6,19) zeigt Homologien zu den katalytischen Untereinheiten verschiedener Eisen-Hydrogenasen, so z. B. zur Hydrogenase-1 von *Clostridium thermocellum* (59,7 % Identität; Acc. Nr. AAD33071), sowie weiteren clostridiellen monomeren Eisen-Hydrogenasen wie der Hydrogenase-1 von *Clostridium pasteurianum* (45,9 % Identität; MEYER UND GAGNON 1991), deren dreidimensionale Struktur aufgeklärt ist (PETERS et al. 1998), und zu HndD der tetrameren Eisen-Hydrogenase von *D. fructosovorans* (49,9 % Identität; MALKI et al. 1995). Bis auf eine Ausnahme sind alle Aminosäuren konserviert, die bei der Röntgenkristallstrukturuntersuchung der Hydrogenase-1 von *C. pasteurianum* als an der Bildung des [2Fe-2S]- bzw. der [4Fe-4S]-Cluster oder für die Ausbildung des H-Clusters beteiligt identifiziert wurden. Das Cys-300, das an der Bildung des H-Clusters beteiligt sein soll, ist bei HymC durch Serin ersetzt, dieser Austausch tritt auch bei der Hydrogenase-1 von *C. thermocellum* auf. Stattdessen befindet sich ein nur bei diesen beiden Organismen konserviertes Cystein in Position 321. Der N-terminale Bereich von HymC zeigt wiederum Sequenzähnlichkeiten zu den N-terminalen Region von FdhA und FdhB, die Cysteinreste bzw. der Histidinrest, die bei FdhA und FdhB vermutlich am Aufbau der Eisen-Schwefel-Zentren C1 bis C4 beteiligt sind, sind in HymC ebenfalls konserviert (Abb. 3.3).

Hym A (157 AS, 16,9 kDa, pI 5,45) zeigt die höchste Homologie zu der Untereinheit A der putativen NADP-reduzierenden Hydrogenase von *Thermotoga maritima* MSB8 (42,6 % Identität; NELSON et al. 1999), aber auch zu HndA von *D. fructosovorans* (35,7 % Identität; MALKI et al. 1995). HndA wird eine Funktion als elektronenleitende Untereinheit zugewiesen, ein [2Fe-2S]-Cluster konnte in HndA von *D. fructosovorans* durch EPR-Analysen nachgewiesen werden (DE LUCA et al. 1998). Die Cystein-Reste, die dieses Cluster bilden, sind auch in HymA konserviert.

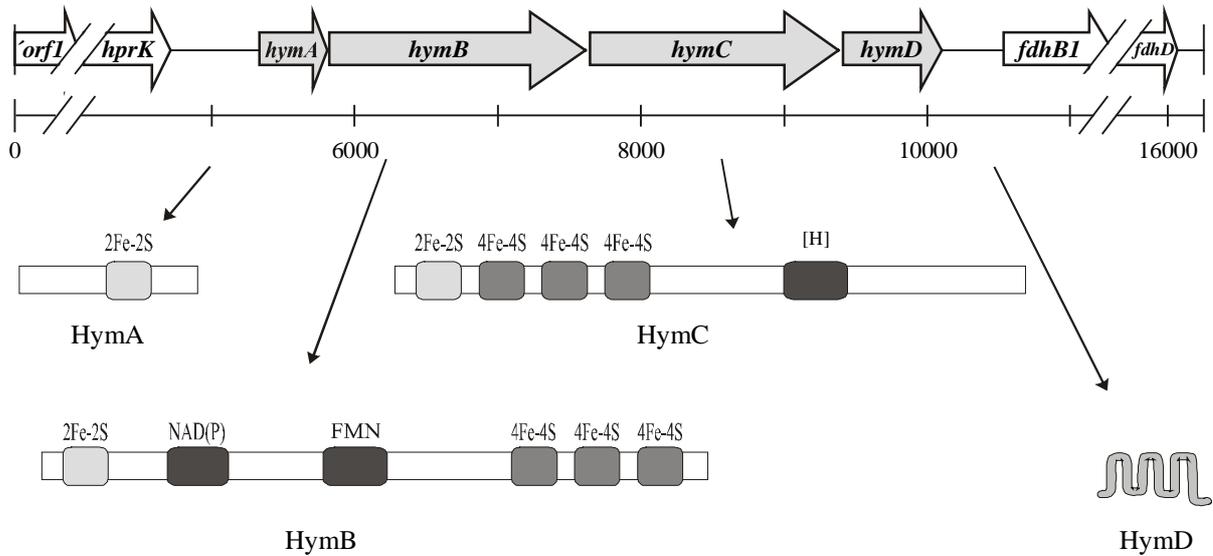


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der *hym*-Genregion sowie der Domänenstruktur der entsprechenden Untereinheiten der Hydrogenase.

HymB (597 AS, 64,8 kDa, pI 5,44) zeigt die höchste Homologie zu der um 10 Aminosäuren längeren Untereinheit C der NADP-reduzierenden Hydrogenase von *T. maritima* MSB8 (59,7 % Identität; NELSON et al. 1999). HndC von *D. fructosovorans* ist im Vergleich zu HymB N-terminal um 107 Aminosäuren verkürzt, berechnet auf die tatsächliche Länge des Alignments beträgt die Identität 64,5 %. HndC dient als NADP-reduzierende Untereinheit der Eisen-Hydrogenase. Bereiche, die für die Bindung der Cofaktoren NAD/NADP (GxGxxGxxxG, AS 177-186) und FMN-Bindung (AS 279-329) verantwortlich gemacht werden, sind auch in HymB hoch konserviert, ebenso wie Cysteine, die vermutlich an der Bildung von drei [4Fe-4S]-Zentren beteiligt sind (Abb. 3.3). Interessant ist, dass bei HndC von *E. acidaminophilum*, HndC von *D. fructosovorans*, und der Untereinheit C der NADP-reduzierenden Hydrogenase von *T. maritima* MSB8 bei dem von der Sequenz her „mittleren“ [4Fe-4S]-Cluster nach dem vierten Cystein in dem konservierten Motiv CxxCxxCxxxC wiederum im Abstand von 3 Aminosäuren ein Cystein nachfolgt, wie dies auch bei den beiden [4Fe-4S]-Zentren des Ferredoxins aus *E. acidaminophilum* (s. 3.7.5) der Fall ist. Der N-terminale Bereich von HymB, der bei HndC von *D. fructosovorans* gänzlich fehlt, ist nur schwach konserviert. In diesem Bereich befinden sich aber vier konservierte Cysteine, die in zwei Paaren jeweils im Abstand von 5 (CxxxxC) bzw. 4 (CxxxC) Aminosäuren voneinander angeordnet sind. Das gleiche Sequenzmuster findet sich auch in HymA. Auch der Abstand zwischen den beiden Paaren ist vergleichbar, 31 Aminosäuren in HymB bzw. 36 Aminosäuren in HymA. In HymA sind diese Cysteine vermutlich am Aufbau eines [2Fe-2S]-Clusters beteiligt, für den N-terminalen Teil von HymB kann daher auch ein [2Fe-2S]-Zentrum postuliert werden. Interessanterweise kommt in der 126 Aminosäuren umfassenden Untereinheit HndB von *D. fructosovorans*, der bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte, ebenfalls ein Cystein-Paar (CxxxC) vor, das einen ähnlichen Abstand zum N-Terminus aufweist wie das CxxxC-Motiv in HymB.

HymD (212 AS, 23,3 kDa, pI 10,12) zeigt keine signifikanten Homologien zu bereits bekannten Proteinen. Sehr schwache Ähnlichkeit hat es zu verschiedenen Membranproteinen, so z. B. auch zu Permeasen. Mit dem Programm TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-1.0>) wurden sechs transmembrane Helices vorhergesagt, wobei N- und C-Terminus im Cytoplasma lokalisiert wären (Abb. 3.4). HymD ist ein auffallend hydrophobes Protein, es besitzt nur 3 negativ, sowie 17 positiv geladene Aminosäuren.

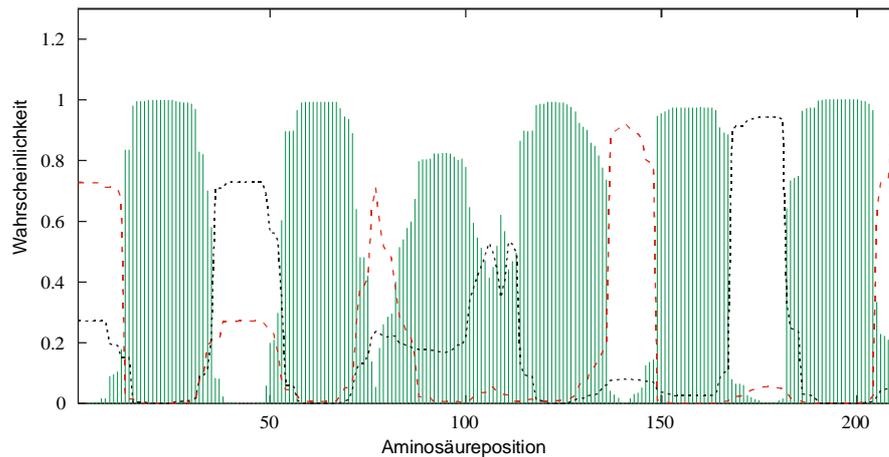


Abb. 3.4: Hydropathie-Plot des HymD-Proteins. Gezeigt ist der mit dem Programm TMHMM berechnete Plot (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-1.0>). Potentiell transmembrane Bereiche sind grün dargestellt. Die gestrichelten Linien geben an, mit welcher Wahrscheinlichkeit sind die entsprechende Proteinregion im Cytoplasma (rot) oder jenseits der Membran (schwarz) befindet.

Weitere offene Leserahmen wurden im 5'-flankierenden Bereich identifiziert (Abb. 3.1). 'Orf1 und Orf3 zeigen Ähnlichkeiten zu SsuB bzw. SsuA von *Bacillus subtilis*. Diese Proteine sind Teil eines für die Aufnahme von aliphatischen Sulfonaten spezifischen ABC-Transporters (VAN DER PLOEG et al. 1998). Zwischen *orf1* und *orf3* wurde der nur 246 bp umfassende *orf2* identifiziert. Orf2 weist 38 % Identität zu einem hypothetischen 9,5 kDa-großen Protein von *T. maritima* auf (TM1266, Acc. No. AE001782), das dort aber in gänzlich anderer genetischer Umgebung vorliegt. 103 bp stromabwärts von *orf3* wurde *uvrC* identifiziert, das für die Untereinheit C einer Excinuclease codiert. *uvrC* überlappt um 14 bp mit einem Gen, dessen Produkt Homologien zu Hpr-Kinasen zeigt. Dieses Gen ist von *hymA* durch einem intergenen Raum von 597 bp getrennt.

Die Frage, ob diese offenen Leserahmen aktive Gene darstellen, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend beantwortet werden. Die Codonbenutzung in diesen Genen weicht von der von *E. acidaminophilum* verwendeten nicht ab (s. 3.1.7). Bisher wurde nicht untersucht, ob *E. acidaminophilum* in der Lage ist, aliphatische Sulfonate als Schwefel-Quelle zu nutzen. Die Proteinsequenz der von *hprK* codierten Hpr-Kinase weist die für diese Familie typische Sequenz 201-EIRGVGL-208 auf, ebenso wie zwei konservierte ATP/GTP-Bindemotive (GX₄GKS). Hpr-Kinasen sind an der Katabolit-Repression

über das Phosphotransferase-System, aber auch an der Transkriptionsregulation beteiligt (REIZER et al. 1998). Da *E. acidaminophilum* keine Zucker verwerten kann, ergibt ein Zusammenhang mit der Katabolit-Repression keinen Sinn. Möglicherweise ist die Hpr-Kinase bei *E. acidaminophilum* an anderen regulatorischen Systemen beteiligt oder es handelt sich um ein inaktives Gen. Ein Sequenzvergleich mit der bekannten Sequenz von *Clostridium difficile* ergab, dass auch hier in räumlicher Nähe eines Hydrogenase-Operons (bestehend aus *hymABC*-homologen Genen) *hprK* stromabwärts des dort kompletten *uvr*-Operons gelegen ist (http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_difficile/blast_server.shtml).

3.1.6 Charakterisierung der klonierten Bereiche und seiner Genprodukte

Die 16133 bp umfassende Hydrogenase- und Formiat-Dehydrogenase-Genregion enthält 14 offene Leserahmen, die alle in die gleiche Richtung orientiert sind. Gene im *hym*- und *fdh*-Operon sind bis auf *hymD* und *fdhB1* (361 bp Abstand) nur durch maximal 39 bp Basen getrennt bzw. sogar überlappend angeordnet. Auch die offenen Leserahmen in der 5'-flankierenden Region weisen nur geringe Abstände (maximal 88 bp) oder Überlappungen auf. Der größte Abstand befindet sich mit 597 bp zwischen *hprK* und *hymA*.

Auf pFDH2/3 (8135 bp) sind die Abstände mit 114 zwischen *fdhB2* und *fdhA2* bzw. 74 bp zwischen *fdhA2* und *fdhC* etwas größer. Zwischen *fdhC* und dem konvergent orientierten *slpB* befindet sich ein intergenerer Raum von 441 bp.

Als Startcodon wird bei *fdhB1*, *mog* und *hprK* TTG, bei *mobA* und *hymD* GTG verwendet, bei allen anderen ATG. Als Stopcodons werden vorwiegend TAA und TAG verwendet, wohingegen der Gebrauch von TGA, das auch für Selenocystein codieren kann, als Stopcodon in *E. acidaminophilum* eher selten ist. *mobA* war das erste nachweislich transkribierte Gen (s. 3.1.8), das mit einem TGA endet. Auch *slpB* und *hprK* weisen ein TGA-Stopcodon auf.

Im Abstand von 6 bis 12 bp stromaufwärts des jeweiligen Startcodons konnte bei allen Genen eine Sequenz identifiziert werden, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur bekannten Region bei *E. coli* (SHINE und DALGARNO 1974) und Clostridien (YOUNG et al. 1989) als Ribosomenbindestelle identifiziert werden konnte.

3.1.7 Codonnutzung in den sequenzierten Genen von *E. acidaminophilum*

Zur Erstellung einer Codonnutzungstabelle von *E. acidaminophilum* wurden alle Gene der *fdh*- und des *hym*-Operons herangezogen, die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Berechnet wurde jeweils der Anteil, den ein Codon an der Gesamtzahl der Codons einer Aminosäure hat. Eingegangen sind insgesamt 4902 Codons. Die erhaltenen Werte wurden mit der Codonnutzungstabelle verglichen, die bei der Codon

Tabelle 6: Codonnutzung in *E. acidaminophilum*. Die Codonnutzung in den Genen, die in dieser Arbeit identifiziert wurden, ist mit der Codonnutzung von *E. acidaminophilum* aus der Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>; Stand 17.8.2000), sowie den Genen *slpB*, *meaC* und *reaC* verglichen. Angegeben ist jeweils der Anteil (in %), den ein Codon einer Aminosäure verwendet wird (100 % ist die Summe aller verwendeten Codons einer Aminosäure), sowie die Verwendung eines Codons bezogen auf alle Codons (in %). Für die Codonnutzung dieser Arbeit wurden die Gene *fdhA1*, *fdhA2*, *fdhB1*, *fdhB2*, *fdhD*, *fdhC*, *mog*, *mobA*, *hymA*, *hymB*, *hymC* und *hymD* zugrunde gelegt. (¹ Codon-Nutzung)

Codon-	Codon-N. ¹	Codon-N.	Codon-N.	Codon-N.	Codon-N.	Gesamtanteil	Gesamtanteil	Codon-	Codon-N.	Codon-N.	Codon-N.	Codon-N.	Codon-N.	Gesamtanteil	Gesamtanteil
Aminosäure (diese Arbeit)	(Database)	<i>slpB</i>	<i>meaC</i>	<i>reaC</i> (diese Arbeit)	(Database)			Aminosäure (diese Arbeit)	(Database)	<i>slpB</i>	<i>meaC</i>	<i>reaC</i> (diese Arbeit)	(Database)		
TTT-Phe	38,1	36,1	37,5	81,3	89,3	1,3	1,3	TAT-Tyr	46,7	44,5	22,7	73,7	78,6	1,4	1,4
TTC-Phe	61,9	63,9	62,5	18,8	10,7	2,1	2,2	TAC-Tyr	53,3	55,5	77,3	26,3	21,4	1,7	1,8
TTA-Leu	3,4	4,4	5,2	38,0	34,0	0,3	0,3	TAA-***	66,7	56,5	0	100	0	0,2	0,2
TTG-Leu	5,6	5,8	8,6	20	21,3	0,5	0,5	TAG-***	25,0	43,5	0	0	0	0,1	0,1
CTT-Leu	52,4	46,2	34,5	16,0	14,9	4,4	3,6	CAT-His	30,8	39,5	42,9	72,7	77,8	0,5	0,6
CTC-Leu	12,1	13,8	20,7	2,0	0	1,0	1,1	CAC-His	69,2	60,5	57,1	27,3	22,2	1,1	0,9
CTA-Leu	9,7	14,6	1,7	12,0	25,5	0,8	1,1	CAA-Gln	29,9	33,5	12,9	60	77,8	0,7	0,8
CTG-Leu	16,7	15,2	29,3	12,0	4,3	1,4	1,2	CAG-Gln	70,1	66,5	87,1	40	22,2	1,5	1,5
ATT-Ile	15,1	15,9	17,6	53,2	54,0	1,0	1,2	AAT-Asn	29,1	30	36,4	76,6	80	1,2	1,1
ATC-Ile	9,8	14,1	9,8	17,0	14,0	0,7	1,1	AAC-Asn	70,9	70	63,6	23,4	20	2,9	2,6
ATA-Ile	75,1	69,9	72,5	29,8	32,0	5,2	5,3	AAA-Lys	39,1	41,1	34,8	74,5	73,9	2,8	3,0
ATG-Met	100	100	100	100	100	2,8	3,4	AAG-Lys	60,9	58,9	65,2	25,5	26,1	4,3	4,3
GTT-Val	36,3	33,4	11,3	44,4	46,4	2,9	2,9	GAT-Asp	33,3	36,6	45,3	85,4	75,8	1,7	2,2
GTC-Val	11,1	10,4	22,6	8,3	17,9	0,9	0,9	GAC-Asp	66,7	63,4	54,7	14,6	24,2	3,4	3,9
GTA-Val	31,0	37,6	24,2	33,3	17,9	2,5	3,2	GAA-Glu	51,4	52,1	40,3	70,7	54,9	3,8	4,3
GTG-Val	21,7	18,5	41,9	13,9	17,9	1,8	1,6	GAG-Glu	48,6	47,9	59,7	29,3	45,1	3,5	4,0
TCT-Ser	16,9	20,8	10,8	21,6	17,1	0,9	1,2	TGT-Cys	20,7	30,5	0	85,7	60	0,7	0,4
TCC-Ser	8,8	5,7	24,3	7,8	9,8	0,5	0,3	TGC-Cys	79,3	69,5	100	14,3	40	2,7	0,8
TCA-Ser	26,5	26,8	12,2	41,2	31,7	1,5	1,5	TGA-***	8,3	0	100	0	100	0	0
TCG-Ser	11,8	12,5	10,8	3,9	2,4	0,7	0,7	TGA-Sec	100	100	0	0	0	0	0,1
CCT-Pro	39,2	37,1	29,4	34,5	30	1,5	1,3	TGG-Trp	100	100	100	100	100	0,6	0,4
CCC-Pro	7,4	7,5	35,3	13,8	15,0	0,3	0,3	CGT-Arg	1,8	4,4	5,0	6,5	14,0	0,1	0,2
CCA-Pro	22,2	41,1	5,9	44,8	35,0	0,9	1,4	CGC-Arg	3,7	3,5	2,5	9,7	0	0,2	0,1
CCG-Pro	31,2	14,3	29,4	6,9	20	1,2	0,5	CGA-Arg	0,5	3,2	2,5	9,7	20,9	0	0,1
ACT-Thr	35,3	28,8	8,8	25,0	41,4	1,9	1,4	CGG-Arg	1,8	3,2	12,5	6,5	0	0,1	0,1
ACC-Thr	7,8	8,6	17,6	3,6	0	0,4	0,4	AGT-Ser	6,3	4,6	4,1	15,7	31,7	0,3	0,3
ACA-Thr	46,5	49,5	38,2	53,6	37,9	2,4	2,4	AGC-Ser	29,8	29,6	37,8	9,8	7,3	1,7	1,7
ACG-Thr	10,5	13,1	35,3	17,9	20,7	0,6	0,6	AGA-Arg	55,3	50,2	30,0	54,8	60,5	2,4	2,0
GCT-Ala	25,9	27,8	15,2	30,6	36,2	2,2	2,2	AGG-Arg	36,9	35,6	47,5	12,9	4,7	1,6	1,4
GCC-Ala	21,8	19,8	36,4	13,9	10,6	1,8	1,6	GGT-Gly	10,3	14,2	8,3	32,3	20,7	0,8	1,2
GCA-Ala	32,4	39,2	25,8	41,7	40,4	2,7	3,1	GGC-Gly	37,1	37,0	58,3	9,7	20,7	3,0	3,2
GCG-Ala	19,9	13,2	22,7	13,9	12,8	1,7	1,1	GGA-Gly	46,6	44,2	15,5	35,5	37,9	3,8	3,8
								GGG-Gly	6,0	4,6	17,9	22,6	20,7	0,5	0,4

Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>; Stand 17.8.2000) abrufbar ist. Für die Berechnung dieser Tabelle wurden 7961 Codons aus 24 Genen herangezogen. Der Codongebrauch der Gene des *hym*- und der *fdh*-Operons weicht nicht signifikant von dem der anderen Gene von *E. acidaminophilum* ab. Als Ausnahme muss das Prolin-codierende Codonpaar CCA/CCG genannt werden. In den Genen des *hym*- und der *fdh*-Operons wird CCG (31,2 %) gegenüber CCA (22,2 %) bevorzugt, während es sonst umgekehrt ist (CCG 14,3 %, CCA 41,1 %). Bei einem Vergleich der Anteile eines Codons an allen Codons fällt nur ein Unterschied bei der Verwendung von Cystein auf (3,4 % gegenüber 1,2 %), was durch die hohe Anzahl von Eisen-Schwefel-Proteinen im *hym*- und den *fdh*-Operons aber nicht ungewöhnlich ist. Die erstellte Tabelle wurde verwendet, um neu identifizierte offene Leserahmen im Hinblick auf eine codierende Funktion zu überprüfen. Für die Gene im 5'-flankierenden Bereich des *hym*-Operons (Daten nicht gezeigt) sowie *slpB* (Tabelle 6) konnte keine signifikante Abweichung festgestellt werden. Beträchtliche Unterschiede in der Codonnutzung wurden bei den Genen des Restriktions-Modifikations-Systems von *E. acidaminophilum* festgestellt, das in 3.7.6 näher analysiert wird.

3.1.8 Untersuchungen zur Transkription

Wie bereits in 3.1.6 erwähnt, sind die Gene des *fdh*-Gensatzes I (*fdhB1A1-mog-mobA-fdhD*) jeweils nur wenige Basenpaare voneinander getrennt, ebenso die Gene des *fdh*-Gensatzes II (*fdhB2A2C*) und die Gene des *hym*-Operons (*hymABCD*). Jeweils stromaufwärts und -abwärts befinden sich längere nicht-codierende Bereiche. Die genomische Anordnung war ein Hinweis darauf, dass die entsprechenden Gene Transkriptionseinheiten bilden könnten.

Um die Co-Transkription der genannten Gene nachzuweisen, wurden Northern-Blot-Experimente durchgeführt, in denen Digoxigenin-markierte PCR-Sonden verwendet wurden. Gesamt-RNA aus *E. acidaminophilum*, die aus in Glycin- (50 mM) bzw. Serin-Formiat-Betain-Medium (10/40/70 mM) gewachsenen Zellen isoliert worden war, wurde mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese getrennt, geblottet und hybridisiert.

Mittels Northern-Blot-Analyse konnte für *fdh*-Gensatz I mit allen verwendeten Sonden ein ca. 6,3 kb-Transkript identifiziert werden (Abb. 3.5A), das der Länge der Gene von *fdhB1* bis mindestens *fdhD* entsprach (Abb. 3.5B). Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes wurden *primer extension*-Reaktionen mittels Fragmentlängenanalyse durchgeführt (Abb. 3.6). Als Transkriptionsstart konnte ein Guanin 343 bp stromaufwärts des Startcodons bestimmt werden. Die Sequenz stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes zeigt keinerlei Ähnlichkeit zu Konsensus-Sequenzen bekannter Promotoren (WÖSTEN 1998). Zwischen den Startpunkten für Transkription und Translation befindet sich ein *inverted repeat*, der Ähnlichkeit zu einer Sequenz zeigt (Abb. 3.7), die sich bei dem Glycin-Reduktase-Thioredoxin-System-Operon von *C. sticklandii* ebenfalls zwischen den Startpunkten von Transkription und Translation befindet (GRAENTZDOERFFER et al. 2000). Auch dort beginnt die Transkription 305 bp

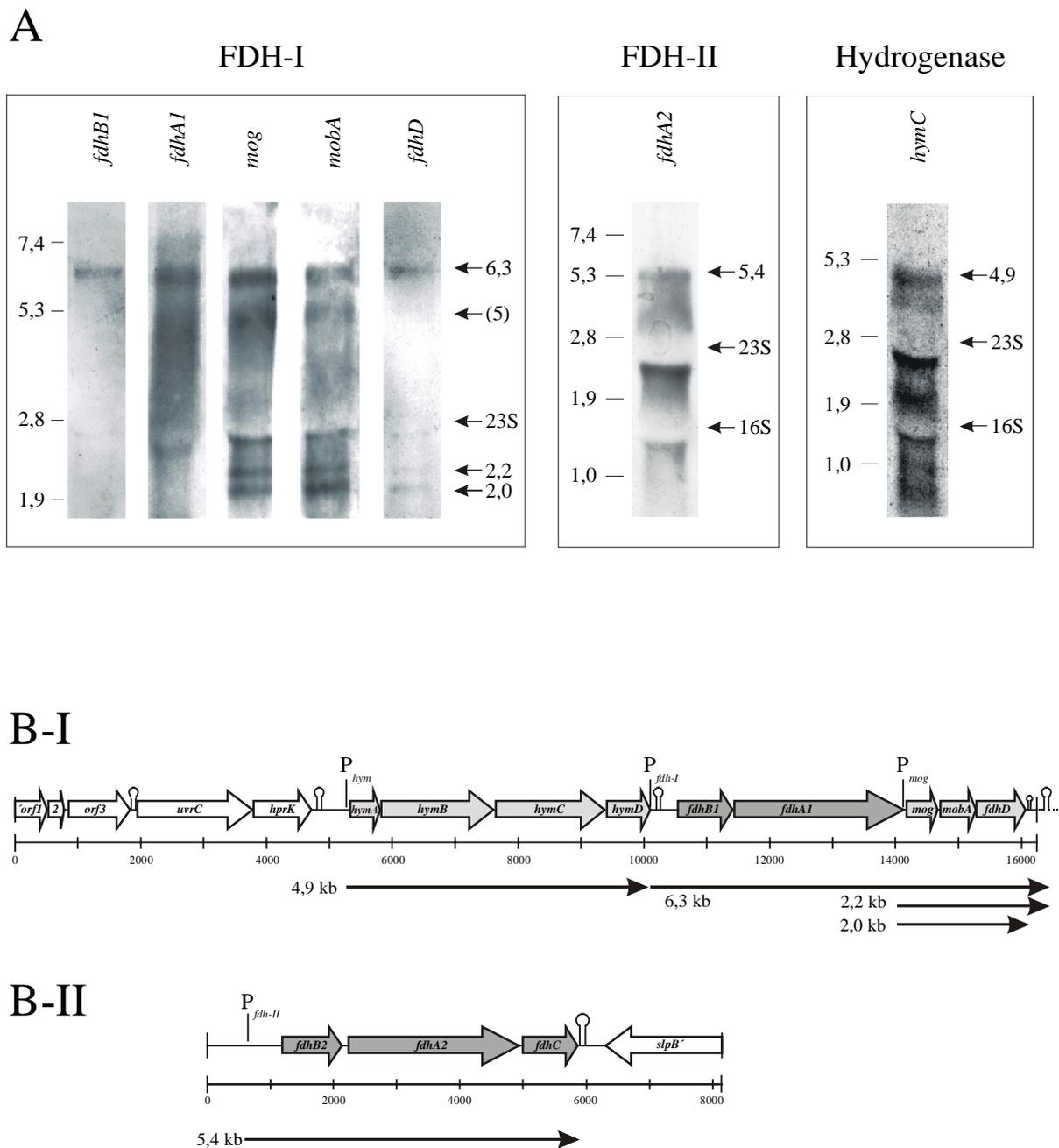


Abb. 3.5: Transkription der *fdh*- und des *hym*-Operons von *E. acidaminophilum*. **A:** Northern-Blot-Analysen von Gesamt-RNA aus *E. acidaminophilum*-Zellen. Die Hybridisierung erfolgte mit den oberhalb der Blots angegebenen Sonden. Spezifische Signale sowie 16- und 23S rRNA sind mit Pfeil gekennzeichnet, die Größen sind in kb angegeben. Fragmentgrößen des RNA-Standards sind auf der jeweils linken Seite in kb dargestellt. **B:** Zuordnung der nachgewiesenen Transkripte der *fdh*-Gensätze I und II sowie des *hym*-Operons. Die Transkripte sind durch Pfeile dargestellt und den entsprechenden Genregionen zugeordnet. Ebenfalls eingezeichnet sind identifizierte bzw. postulierte Promotoren sowie Sekundärstrukturen, die als Terminatoren dienen könnten.

natorstrukturen, von denen die erste nicht vollständig terminiert. Bei *primer extension*-Experimenten wurden mehr als zwei Fragmente erhalten (Abb. 3.6), bei keinem der möglichen Startpunkte konnte eine Ähnlichkeit zu einer der Promotor-Konsensus-Sequenzen gefunden werden.

Eine Haarnadelstruktur, die als Terminator dienen könnte, wurde ca. 60 bp stromabwärts des 3'-Endes von pFDH1/3 identifiziert. Die Sequenz jenseits der *EcoRI*-Schnittstelle von pFDH1/3 wurde von K. Makdessi im Rahmen einer Dissertation kloniert und sequenziert (MAKDESSI 2000). Die Haarnadelstruktur mit einem Stamm von 7 bp und einem 4 bp-Loop weist eine Energie von -11,6 kcal/mol auf und wird von einer T-reichen Region gefolgt, wie dies für *rho*-unabhängige Terminatoren üblich ist (PLATT 1986; D'AUBENTHON CARAFA et al. 1990). Somit ergibt sich eine Transkriptlänge von ca. 6170 bp, die gut mit dem experimentellen Ergebnis übereinstimmt. Rechnet man von der Terminatorstruktur 2,2 kb zurück, so kommt man in den Bereich, in dem das stärkste *primer extension*-Signal mit dem *mog*-Primer erhalten wurde (59 Basen Länge, P_{mog} , Abb. 3.6). Auch befände sich 200 bp stromaufwärts des Terminators eine weitere Haarnadelstruktur, die eine geringere Energie aufweist (-9,7 kcal/mol), einen Stamm von nur 5 bp besitzt, von denen ein bp nicht passt und auch nur von drei T-Resten gefolgt wird. Es wäre daher denkbar, dass diese Struktur einen weniger effizienten Terminator darstellt, so dass ein Teil der Transkripte erst bei dem nächsten Terminator abbricht. Damit ließen sich die 2,2 und 2,0 kb-Transkripte erklären. Für größere Transkripte ist die Trennung im Gel nicht ausreichend gut, als dass eine derartige Größendifferenz zwei distinkte Banden ergäbe.

Northern-Blot-Analysen, die mit einer gegen *fdhA2* gerichteten Sonde durchgeführt wurden (die Spezifität der Sonde für Gensatz II wurde durch Southern-Hybridisierung überprüft), zeigten eine gemeinsame Transkription von *fdhB2A2C* (Abb. 3.5A) in Form eines ca. 5,4 kb-Transkripts.

Desweiteren zeigte sich, dass unter den untersuchten Bedingungen Gensatz II im Vergleich zu Gensatz I wesentlich seltener transkribiert wurde (s. 3.1.9). Nur mit einer einzigen RNA-Charge konnte ein Signal für Gensatz II erhalten werden. Vermutlich waren die durchgeführten *primer extension*-Experimente zur Identifizierung des Promotors stromaufwärts von *fdhB2* auch aus diesem Grunde erfolglos. Nachdem durch RT-PCR (s. 3.1.9) gezeigt werden konnte, dass Gensatz II in mit Serin angezogenen Zellen stärker exprimiert wird, wurden die *primer extension*-Experimente mit RNA aus entsprechenden Zellen wiederholt, ergaben aber ebenfalls kein Signal (Daten nicht gezeigt).

Eine Haarnadelstruktur beginnt 32 bp stromabwärts von *fdhC*. Sie besitzt einen Stamm von 26 bp (ein *mismatch*), einen 7 bp-Loop und weist eine Energie von -52,3 kcal/mol auf. Geht man davon aus, dass diese Struktur einen Terminator darstellt, und rechnet 5,4 kb zurück (entsprechend der bestimmten Transkriptlänge), so müsste der Promotor ca. 600 bp stromaufwärts von *fdhB2* lokalisiert sein. Da für die *primer extension*-Experimente ein Primer verwendet wurde, der komplementär zu den Basen 86-104 von *fdhB2* war, hätte das *primer extension*-Produkt über 700 Basen lang sein müssen. Fragmente dieser Größenordnung sind bei noch dazu geringen eingesetzten RNA-Mengen nicht nachweisbar. Dies könnte erklären, warum kein Signal in den *primer extension*-Experimenten erhalten wurde. Ein Primer, der dichter an dem postulierten Startpunkt liegt, wurde jedoch nicht mehr eingesetzt.

Bei Northern-Blot-Analysen mit einer Sonde gegen *hymC* wurde ein Transkript mit der Länge von ca. 4,9 kb nachgewiesen (Abb. 3.5A). Dies würde dem Bereich von *hymA* bis *hymD* entsprechen (Abb. 3.5B), vom *hymA*-Startcodon bis zum *hymD*-Stopcodon sind es 4766 bp. Da dies recht knapp ist, um die zusätzliche Sequenz bis zum Promotor stromaufwärts und bis zum Terminator stromabwärts zu umfassen, wurde eine RT-PCR durchgeführt, um eine gemeinsame Transkription von *hymD* mit *hymC* nachzuweisen. Für die PCR mit dem Primerpaar *fdh26* (*hymC* →)/*orfM-N2* (*hymD* ←) wurde cDNA verwendet, die durch eine RT-Reaktion mit Hexanukleotiden hergestellt wurde. Ein Fragment in der richtigen Größe von 660 bp wurde erhalten (Daten nicht gezeigt), was auf eine gemeinsame Transkription von *hymD* mit *hymC* hindeutet. Als Negativkontrollen wurden PCRs mit zwei verschiedenen Primerpaaren zwischen *hymD* und *fdhB1* durchgeführt, die kein Produkt ergaben.

Alle erhaltenen Erkenntnisse hinsichtlich Transkription, Promotoren und Terminatoren sind schematisch in Abb. 3.5B zusammengefasst.

3.1.9 RT-PCR zur Quantifizierung der Transkription der verschiedenen Gensätze

Die Northern-Blot-Analysen hatten angedeutet, dass die beiden *fdh*-Gensätze unterschiedlich stark exprimiert werden (s. 3.1.8). Mit Hilfe von semi-quantitativen RT-PCRs sollte untersucht werden, ob dies von der Wahl der Substrate abhängig war. Von besonderem Interesse waren diese Untersuchungen, nachdem die von *fdh*-Gensatz II codierte FDH-II aus Serin-Formiat-Zellen homogen dargestellt werden konnte (s. 3.4.4).

Dazu wurde *E. acidaminophilum* mit den folgenden Substraten angezogen: Glycin (50 mM), Serin/Formiat/Betain (10/40/70 mM), Serin/Formiat/Betain (40/30/20 mM), Serin (40 mM) und Serin/Formiat (40/30 mM). In der spät-logarithmischen Wachstumsphase wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert. Nach einer DNase-Behandlung wurde eine reverse Transkription durchgeführt, wobei ein Hexanukleotid-Gemisch als Primer diente. Somit konnte die erhaltene cDNA für den Nachweis verschiedener mRNAs verwendet werden. Von der cDNA wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (in Zehnerschritten), die als Template für *fdh*-Gensatz I bzw. *fdh*-Gensatz II-spezifische PCRs diente. In beiden Fällen kamen Primerpaare aus *fdhB* zur Anwendung, *fdh22/fdhB1-N2* für Gensatz I und *fdhB2-N1/fdhB2-N2* für Gensatz II. Die erwarteten PCR-Produkte wiesen mit ca. 500 bp eine vergleichbare Länge auf.

Gensatz I-spezifische mRNA war mittels PCR in allen untersuchten RNA-Isolationen bis zu einer Verdünnung von 10^{-2} nachweisbar, in RNA aus Glycin- und Serin/Formiat/Betain (40/30/20 mM)-gewachsenen Zellen sogar bis 10^{-3} , so dass von einer konstitutiven Expression ausgegangen werden kann.

Bei dem Nachweis Gensatz II-spezifischer mRNA gab es Anzeichen für eine Induktion der Expression durch Serin. In RNA aus mit Glycin- und Serin/Formiat/Betain (10/40/70 mM)-gewachsenen Zellen

wurde schon bei einer 10^{-1} -Verdünnung nur noch ein schwaches Produkt erhalten, wohingegen mit RNA aus mit Serin- und Serin/Formiat-angezogenen Zellen sogar noch 10^{-3} -verdünnt und RNA aus Serin/Formiat/Betain (40/30/20 mM)-Zellen 10^{-2} -verdünnt Produkte ergab.

Mit der gleichen Methode (und der gleichen cDNA) wurden Vergleiche der Transkriptionsniveaus der beiden Hydrogenasen durchgeführt. Für den Nachweis der Hydrogenasen wurden Primerpaare aus den katalytischen Untereinheiten *hymC* bzw. *hndD* verwendet, die PCR-Produkte mit einer Länge von ca. 500 bp ergeben sollten (*hym*-Operon: *hyd-N1/hyd-N2*; *hnd*-Operon KH1/2, KEIL 1999). Dabei zeigte sich eine schwache, aber unter den untersuchten Bedingungen konstitutive Expression des *hym*-Operons (für alle RNAs nur noch schwache Produkte mit der 10^{-1} -Verdünnung), das *hnd*-Operon wurde ebenfalls konstitutiv auf etwas höherem Niveau transkribiert (auch noch schwache Signale mit der 10^{-2} -Verdünnung).

3.2 Molekulare Analyse der Formiat-Dehydrogenase von *C. sticklandii*

Der Gram-positive, Aminosäuren vorzugsweise in Stickland-Reaktionen vergärende Anaerobier *Clostridium sticklandii* weist zu *E. acidaminophilum* viele Ähnlichkeiten auf. So besitzt auch *C. sticklandii* mit der Glycin-Reduktase (GARCIA UND STADTMAN 1992; GRAENTZDOERFFER et al. 2000) und Prolin-Reduktase (KABISCH et al. 1999) verschiedene Selenoproteine. Auch gab es Hinweise, dass die Formiat-Dehydrogenase Selen enthalten könnte (TURNER UND STADTMAN 1973). Daher sollte mit Hilfe heterologer Hybridisierung die Formiat-Dehydrogenase von *C. sticklandii* kloniert und sequenziert werden, um sie näher zu charakterisieren.

3.2.1 Identifizierung der Formiat-Dehydrogenase und AOR/CAR von *C. sticklandii*

Mit der zur Identifizierung der Formiat-Dehydrogenasen von *E. acidaminophilum* verwendeten Sonde (s. 3.1.1) wurde zunächst ein Southern-Blot von *C. sticklandii* unter heterologen Bedingungen hybridisiert. Ein spezifisches Signal wurde für ein ca. 6 kb großes *EcoRI*-Fragment erhalten. Aus einer λ -ZAP II-Cosmidbank, die *EcoRI*-Fragmente von 5-10 kb enthielt (GRAENTZDOERFFER et al. 2000) wurde pCSFDH1 mit einer Insertgröße von 6135 bp isoliert und dieses sequenziert. Die Sequenz ist im Anhang zusammen mit den abgeleiteten Proteinsequenzen wiedergegeben und in Abb. 3.8 schematisch dargestellt.

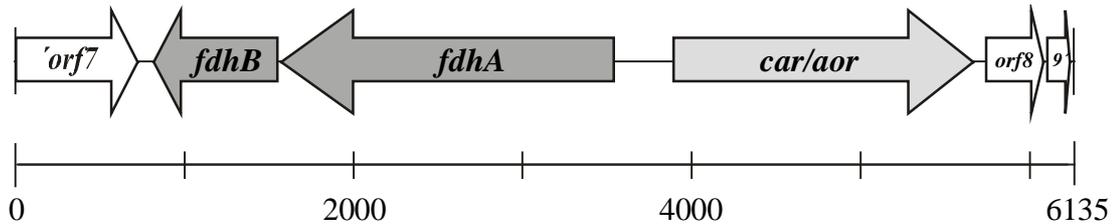


Abb. 3.8: Schematische Darstellung der Anordnung der Gene der *fdh*- und *car/aor*-Region in *C. sticklandii*.

Ein offener Leserahmen konnte der katalytischen Untereinheit der Formiat-Dehydrogenase zugeordnet werden und wird daher mit *fdhA* bezeichnet. Dieses Gen enthält ein *in-frame* TGA-Codon für die Inkorporation von Selenocystein, so dass die Formiat-Dehydrogenase von *C. sticklandii* tatsächlich ein Selenoprotein darstellen sollte. FdhA ist 699 Aminosäuren lang (77,4 kDa, pI 6,0) und gliedert sich damit in die Gruppe der N-terminal verkürzten katalytischen Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenasen ein, die mit dem Motiv C5 beginnen (s. 3.1.3). FdhA ist um 194 bzw. 198 Aminosäuren kürzer als FdhA1 und FdhA2 von *E. acidaminophilum*, zu denen es 53,1 % Identität bzw. 52,3 % Identität und aufweist (bezogen auf die tatsächliche Länge des Alignments). Ebenfalls sehr hohe Homologien zeigte FdhA z. B. zu FdhA von *M. thermoformicicum* (50,8 % Identität), FdhA von *M. formicicum* (48,2 % Identität) oder FdhF von *E. coli* (42,8 % Identität).

24 bp stromabwärts von *fdhA* befindet sich ein offener Leserahmen (*fdhB*), dessen Genprodukt Homologien (41,9 % Identität) zu dem Elektronen-Transport-Protein HydN von *E. coli* aufweist (MAIER et al. 1996). FdhB (19,4 kDa, pI 5,94) ist 179 Aminosäuren lang und weist wie auch HydN 16 konservierte Cysteine auf, die putativ vier Eisen-Schwefel-Zentren bilden. Vermutlich handelt es sich bei diesem Protein um eine zweite Untereinheit der Formiat-Dehydrogenase, die Elektronen auf den natürlichen Elektronenakzeptor überträgt.

Außerdem, und das stellte die eigentliche Überraschung dar, enthält das Insert von pFDHCS1 einen 365 bp stromaufwärts der *fdh*-Gene gelegenen, aber in komplementärer Leserichtung codierten 1740 bp langen offenen Leserahmen, der deutliche Homologien zu Aldehyd-Oxidoreduktasen aus verschiedenen, meist thermophilen Archaea aufweist, bei denen es sich um Wolfram-Enzyme handelt. Auch bei *E. acidaminophilum* wurde in vorangegangenen Arbeiten eine Wolfram-abhängige Aldehyd-Oxidoreduktase (AOR) nachgewiesen, konnte aber aufgrund der extremen Sauerstoffempfindlichkeit nicht angereichert werden (GRANDERATH 1993). Dieses zweite Wolfram-Enzym aus *E. acidaminophilum* wurde jetzt im Rahmen einer Diplomarbeit (RAUH 2000) gereinigt und charakterisiert, sowie das Gen kloniert und sequenziert. Der Versuch, die AOR aus *E. acidaminophilum* durch heterologe Hybridisierung mit einer aus dem putativen *aor*-Gen von *C. sticklandii* abgeleiteten Sonde zu identifizieren, war zuvor fehlgeschlagen. Die AORs aus *C. sticklandii* (579 AS, 61,3 kDa, pI 5,19) und *E. acidaminophilum* (608 AS, 66,4 kDa, pI 4,95) weisen 31,5 % Identität auf. In ähnlicher Größenordnung liegen die Werte für die AOR aus *C. sticklandii* und *P. furiosus* (KLETZIN et al. 1995) mit 32,0 % Identität. Im Gegensatz dazu zeigt die

AOR aus *E. acidaminophilum* wesentlich höhere Homologien zu der AOR aus *P. furiosus* (57,0 % Identität; RAUH 2000).

Dahingegen weist der N-Terminus der AOR von *C. sticklandii* wesentlich höhere Homologien (64 % Identität; Abb. 3.9) zu der Carbonsäure-Reduktase aus *C. formicoaceticum* (WHITE et al. 1991) auf, von der bisher nur der N-Terminus bekannt ist. Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von nicht-aktivierten Carbonsäuren zu Aldehyden, im Prinzip also die Rückreaktion der Aldehyd-Oxidoreduktasen. Auch dieses Enzym ist Wolfram-abhängig, ebenso wie zwei aus *M. thermoacetica* isolierte CARs (WHITE et al. 1989). Die genaue Zuordnung, ob es sich bei dem codierten Protein um eine AOR oder CAR handelt, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Sollte es sich bei dem klonierten Gen von *C. sticklandii* um eine CAR handeln, wäre dies die erste bekannte Gensequenz einer CAR.

<i>C. sticklandii</i> AOR/CAR	1	MQKFIRIDMATLKHEITDVPEKYAG 25
		M KFIR+DM TLK +VP KYAG
<i>C. formicoaceticum</i> CAR	1	MNKFIRVDMTTLKVTTEEVPAKYAG 25
<i>C. sticklandii</i> AOR/CAR	1	MQKFIRIDMATLKHEITDVPEKYAG--LGGRALTSSFVNDEVIPT 43
		+FIR++++T ++ + E+ A LG R L + E+ PT
<i>P. furiosus</i> AOR	1	MYGNWGRFIRVNLSTGDIKVEEYDEELAKKWLGSRLAIYLLLKEMDPT 45

Abb. 3.9: Vergleich der N-terminalen Aminosäure-Sequenzen der AOR von *C. sticklandii* mit denen der CAR von *C. formicoaceticum* (WHITE et al. 1991) und der AOR von *P. furiosus* (KLETZIN et al. 1995). Identische Aminosäuren sind zusätzlich zwischen den Zeilen vermerkt, ähnliche sind mit +, fehlende mit - markiert.

Darüberhinaus können auf pCSFDH1 drei weitere offene Leserahmen postuliert werden. 'Orf7, von dem nur der C-terminale Teil auf dem Plasmid kodiert ist, weist Homologien zu dem hypothetischen konservierten Protein YkoW von *B. subtilis* auf (KUNST et al. 1997). Orf8 (108 AS) und der N-terminale Teil von Orf9' (36 AS) zeigen keinerlei Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen.

Die Expression des *fdhA*- und *aor/car*-Gens wurde durch RT-PCR nachgewiesen. Gesamt-RNA von *C. sticklandii* wurde aus auf Minimalmedium (UHDE 1990) angezogenen Zellen isoliert. Nach DNase-Behandlung und reverser Transkription mit Hexanukleotiden als Primer wurde die cDNA als Template für *fdhA*- bzw. *aor/car*-spezifische PCRs eingesetzt. Als Primerpaare wurden CsFDH2 und CsFDH3 für den Nachweis der Transkription des *fdhA*-Gens und CsFDH5 und CsFDH8 für das *aor/car*-Gen verwendet. In beiden Fällen wurden PCR-Produkte in der erwarteten Größe (FDH: 620 bp; AOR/CAR: 1390 bp) erhalten. Positiv-Kontrollen mit chromosomaler DNA ergaben PCR-Produkte in gleicher Größe, Negativ-Kontrollen mit RNA (zur Kontrolle der DNA-Freiheit) ergaben keine Produkte. Northern-Blot-Analysen der Expression der AOR/CAR, die von David Rauh durchgeführt wurden, deuteten mit einem ca. 2 kb-Transkript eine monocistronische Expression an. Ein zusätzliches Signal wurde bei ca. 2,7 kb erhalten, was auf eine gemeinsame Transkription mit *orf8* und eventuell auch *orf9* hinweist.

Weitere Untersuchungen müssten zeigen, ob die Formiat-Dehydrogenase und AOR/CAR von *C. sticklandii* Wolfram- oder Molybdän-abhängig sind. Im Falle der AOR/CAR handelt es sich vermutlich um ein Wolfram-abhängiges Protein, da bisher noch kein Molybdän-abhängiges Isoenzym dieser Sequenzfamilie bekannt ist.

Die Abhängigkeit des Wachstums von *C. sticklandii* von der Supplementierung von Wolframat oder auch Molybdat ist bisher nicht belegt. Andererseits lassen solche Experimente aber auch nur dann eindeutige Aussagen zu, wenn das Ergebnis die Abhängigkeit des Organismus von dem untersuchten Stoff zeigt. So konnte für *E. acidaminophilum* eine Abhängigkeit von Selen nur bei Wachstum auf Glycin, Betain und Sarkosin gezeigt werden, was nahelegte, dass an der Glycin-, Betain- und Sarkosin-Reduktion mindestens ein Selenoprotein beteiligt ist, nicht aber bei Wachstum auf Serin (ZINDEL et al. 1988). Ein falscher Schluss wäre in diesem Fall, davon auszugehen, dass beim Wachstum auf Serin keine Selenoproteine exprimiert werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt, wird auf Serin im Vergleich zu Glycin die Expression der zweiten ebenfalls Selen-haltigen Formiat-Dehydrogenase sogar um den Faktor 100 verstärkt (s. 3.1.9). Eine mögliche Erklärung dafür, dass trotzdem keine Abhängigkeit von Selen-Supplementation festgestellt werden konnte, liegt in dem wesentlich geringeren Anteil der Formiat-Dehydrogenase am Gesamtproteingehalt im Vergleich zu den Reduktasesystemen begründet. Dies wird auch dadurch deutlich, dass bei Markierungsexperimenten mit radioaktivem Selen durch WAGNER (1997) neben den bereits bekannten, an den Reduktasen beteiligten Selenoproteinen Protein A und der spezifischen Untereinheiten der Substrat-spezifischen Proteine B noch weitere markierte Proteine entdeckt wurden, ein den Formiat-Dehydrogenasen entsprechendes Signal fehlte jedoch.

Aussagekräftige Ergebnisse bezüglich des Metallgehalts der Formiat-Dehydrogenase und AOR/CAR aus *C. sticklandii* wären daher durch eine Charakterisierung der homogenen Enzyme zu erreichen.

3.3 Überexpression von FdhA1 in *E. coli*

Da die Formiat-Dehydrogenasen aus *E. acidaminophilum* wegen ihrer Sauerstoffempfindlichkeit bisher nicht homogen angereichert werden konnten, sollte der Versuch unternommen werden, FdhA1 in *E. coli* zu exprimieren. Bei der heterologen Expression des Wolfram-enthaltenden Selenoproteins FdhA1 von *E. acidaminophilum*, das noch dazu fünf postulierte Eisen-Schwefel-Zentren aufweist, in *E. coli*, waren Probleme absehbar.

Bisher konnten keine Selenoproteine aus *E. acidaminophilum* in *E. coli* als solche exprimiert werden. Die Inkorporation des Selenocysteins in FdhF von *E. coli* ist sehr gut untersucht (Übersichtsartikel: HÜTTENHOFER UND BÖCK 1998), der Selenocystein-spezifische Elongationsfaktor SelB bindet an eine Sekundärstruktur direkt stromabwärts des TGA-Codons. Da für die mRNA von *fdhA1* eine der Sekundärstruktur von *fdhF* sehr ähnliche Struktur postuliert werden kann (Abb. 3.10), wäre eine Expression der FdhA1 als Selenoprotein zumindest wahrscheinlicher als bei anderen Proteinen von *E. acidaminophilum*,

in deren mRNAs sich keine ähnlichen Sekundärstrukturen finden lassen. KLUG et al. (1997) identifizierten die essentiellen Bestandteile der Sekundärstruktur von *fdhF*, die in Abb. 3.10 grau unterlegt sind. Alle als notwendig gefundenen Basen sind auch in der Sekundärstruktur von *fdhA1* vorhanden, allerdings ist der Loop um ein U länger, und das bei *fdhF* ungepaarte U im Stamm liegt bei *fdhA1* gepaart vor. Aus diesem Grund wurde sowohl das Wildtyp-FdhA1 als auch eine Secys-350-Cys-Mutante exprimiert.

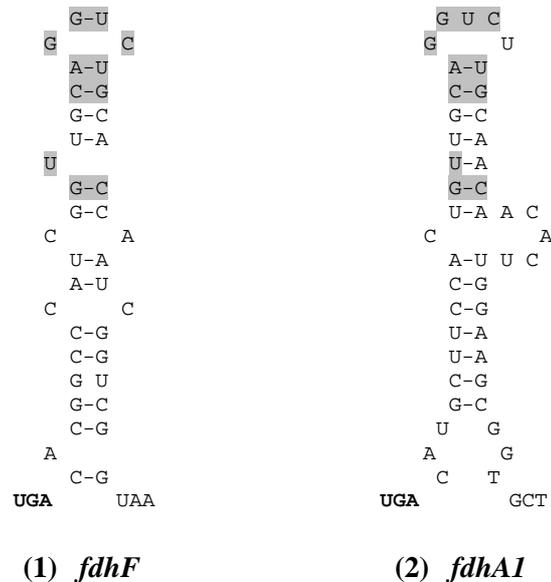


Abb. 3.10: Vergleich der Sekundärstrukturen direkt stromabwärts des UGA-Codons von (1) *fdhF* (*E. coli*) und (2) *fdhA1* (*E. acidaminophilum*). Nach KLUG et al. (1997) für die Bindung von SelB essentielle Basen im Loopbereich sind grau unterlegt.

Die Expression aktiven Proteins war von Anfang an sehr unwahrscheinlich. Selbst wenn FdhA1 als Selenoprotein exprimiert würde, müssten noch ausreichende Mengen des Cofaktors Molybdopterin synthetisiert und eingebaut werden. Da *E. coli* keine Wolfram-Enzyme besitzt, würde statt des Wolframs vermutlich Molybdän eingebaut. Auch dass die Synthese der Eisen-Schwefel-Zentren ohne Schwierigkeiten ablaufen würde, war eher unwahrscheinlich.

3.3.1 Expression von FdhB1 und FdhA1 mit dem IMPACT-System

Für die heterologe Expression von FdhA1 und FdhB1 in *E. coli* wurde zunächst das *IMPACT™ T7:One-Step Protein Purification System* von NEW ENGLAND BioLabs gewählt. Dabei wird das gewünschte Protein an einen Fusionspartner fusioniert, der aus einem selbst-spleißenden Intein und einer Chitin-

Bindedomäne besteht. Nach Bindung des exprimierten Fusionsproteins an eine Chitin-Matrix wird das *Target*-Protein nach der *in vitro*-Spaltung der Fusionspartner eluiert.

Die Expressionsbedingungen wurden zunächst für die Cystein-Mutante von FdhA1 und FdhB1 untersucht. Die Mutation des Selenocysteins zu Cystein wurde mit Hilfe der *overlap-extension* PCR eingeführt. Als Primerpaare wurden zunächst *fdhA1-NdeI* mit M-*fdhA1-U/C-f* und *fdhA1-SalI* mit M-*fdhA1-U/C-r* kombiniert. Die aus chromosomaler DNA von *E. acidaminophilum* amplifizierte Produkte wurden dann als Template in einer zweiten PCR eingesetzt, in der nur *fdhA1-NdeI* und *fdhA1-SalI* eingesetzt wurden. Das erhaltene PCR-Produkt wurde in den Überexpressionsvektor pTYB2 kloniert und zur Kontrolle sequenziert. Für die Amplifikation von *fdhB1* kamen die Primer *fdhB1-NdeI* und *fdhB1-XhoI* zum Einsatz. Die resultierenden Plasmide pFdhA1-Impact und pFdhB1-Impact wurden in den *E. coli* Überexpressionsstamm ER2566 transformiert und die Expressionshauptkulturen direkt von einer Einzelkolonie angeimpft. Trotz Variation der Expressionsbedingungen konnte zunächst weder FdhA1 noch FdhB1 rekombinant nachgewiesen werden. Da FdhB1 theoretisch leichter exprimierbar sein sollte, da es kleiner ist und als einziges Expressionshindernis nur die Eisen-Schwefel-Zentren aufweist, wurden die Bedingungen zunächst für die Expression von FdhB1 optimiert. Es zeigte sich, dass Expressionsprodukte nur nachweisbar waren, wenn die in *E. coli* seltene tRNA für die Arginin-Codons AGG und AGA, die *E. acidaminophilum* im Gegensatz zu *E. coli* überwiegend verwendet (s. 3.1.7), coexprimiert wurde. Dies wurde durch ein zweites mit dem Expressionsvektor kompatibles Plasmid pUBS520 (BRINKMANN 1990) erreicht. Allerdings spaltete sich das FdhB1-Fusionsprodukt bereits *in vivo*, wodurch eine Aufreinigung nicht mehr möglich war. Bei Coexpression der Arginin-tRNA ließ sich das FdhA1-Expressionsprodukt (Cystein-Mutante) ungespaltet exprimieren, jedoch lag das Protein in *inclusion bodies* vor, was eine Aufreinigung gleichfalls unmöglich machte.

3.3.2 Expression von FdhA1 als *Strep-tagII*-Fusion

Mit den pASK-IBA-Expressionsvektoren können rekombinante Proteine exprimiert und durch das *Strep-tagII*-System effizient gereinigt werden. Durch Klonierung des gewünschten Gens in pASK-IBA7 ist das Protein nach Expression mit einem N-terminalen *Strep-tagII* versehen, der auch wieder abgespalten werden kann. Durch Verwendung des Restriktionsenzym *BsaI*, das nicht innerhalb der Erkennungssequenz schneidet, kommt es zu einer gerichteten Klonierung trotz der Verwendung nur eines Enzyms, auch weitere Erkennungssequenzen in der Strukturgensequenz schaden nicht, da die entstehenden Enden der verschiedenen Schnittstellen nicht kompatibel sind. Da Proteine mit einer *Strep-tag*-Fusion auch denaturierend gereinigt werden können, bot sich dieses System für die Expression von FdhA1 an.

Das *fdhA1*-Gen wurde mit den Primern *fdhA1-BsaI-N* und *fdhA1-BsaI-C* aus chromosomaler DNA amplifiziert. Für die Konstruktion der Cystein-Mutante kamen die gleichen Primer zum Einsatz, als Template diente pFdhA1-Impact (s. 3.3.1). Zusätzlich zu diesen beiden Varianten wurden N-terminal

verkürzte Konstrukte von FdhA1 hergestellt, die erst bei Aminosäure 218 mit Methionin statt Threonin beginnen. Dadurch werden die ersten vier Bindemotive für Eisen-Schwefel-Zentren (C1-C4) deletiert, die Polypeptidkette weist die gleiche Länge und alle Motive ab C5 wie die Formiat-Dehydrogenasen kürzeren Typs auf (s. 3.1.3). Als N-terminaler Primer wurde *fdhA1-BsaI-ΔN* in Kombination mit *fdhA1-BsaI-C* eingesetzt, als Template dienten wiederum chromosomale DNA und pFdhA1-Impact. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in den Überexpressionsvektor pASK-IBA7 kloniert und zur Kontrolle sequenziert. Zur Expression wurden die Plasmide in den Expressionsstamm *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert. Dieser Stamm ist für die Expression von Proteinen konstruiert worden, deren Codonnutzung von der von *E. coli* abweicht und exprimiert zusätzlich nicht nur die tRNA für die Arginin-Codons AGG/AGA, sondern auch die tRNAs für die Leucin-Codons UUA/UUG (die *E. acidaminophilum* aber auch nur selten verwendet) und für das Isoleucin-Codon AUA, das von *E. acidaminophilum* zu 75 % verwendet wird. Zunächst wurden pro Variante eine 50 ml-Kultur mit einer Einzelkolonie angeimpft, bei 30 °C inkubiert und bei einer optischen Dichte von 0,5 mit 0,2 μg/ml AHT induziert. Die Zellen wurden mittels French-Press aufgeschlossen und durch Zentrifugation in Pellet und Überstand getrennt. Aliquots aller Proben wurden einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterworfen und geblottet. Die *Strep-tagII*-Fusionsproteine wurden mit dem „*Strep-tag* detection Assay“ nachgewiesen (Abb. 3.11).

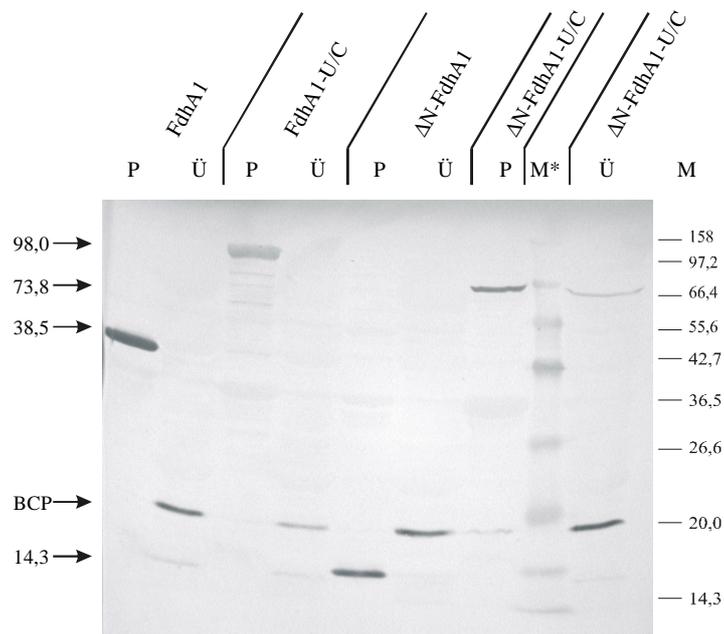


Abb. 3.11: Nachweis der Überexpression verschiedener FdhA1-Varianten mittels Western-Blot. Zellextrakte wurden nach dem Zellaufschluss durch Zentrifugation in lösliche (Überstand, Ü) und unlösliche Bestandteile (Pellet, P) getrennt. Zur Herstellung des Western Blots und Nachweis der *Strep-tag*-Fusionsprotein siehe Text. Die Größe der exprimierten Varianten (in kDa) ist links angegeben. Eine 2. Markerspur (M) wurde nach dem Blotten abgeschnitten und angefärbt. Die Größen der Standardproteine (in kDa) sind am rechten Rand angegeben. Die Proteine des prestained-Molekulargewichtsmarkers (M*), der auf dem Blot zu sehen ist, laufen durch die kovalente Bindung des Farbstoffs langsamer als ihrem Molekulargewicht entsprechend. Das lösliche Biotin-Carrier-Protein (BCP) von *E. coli*, das bei ca. 20 kDa läuft, reagiert ebenfalls positiv auf den *Strep-tag*-Antikörper-Nachweis.

In allen vier Ansätzen konnte exprimiertes Fusionsprotein nachgewiesen werden. Die Varianten Wildtyp-FdhA1 (in voller Länge) und Δ N-FdhA1 (N-terminal verkürzt) wurden nur verkürzt exprimiert, die detektierten Größen korrelieren mit einem Abbruch am TGA-Codon, während die entsprechenden Cystein-Mutanten FdhA1-U/C und Δ N-FdhA1-U/C Proteine lieferten, die Signale ergaben, die mit den für das komplette Protein errechneten Größen übereinstimmen. Als Teilergebnis läßt sich daher festhalten, dass auch die Sekundärstruktur der mRNA von *fdhA1* von *E. acidaminophilum* für die Inkorporation von Selenocystein in *E. coli* nicht ausreichend konserviert ist.

Nur im Falle der Variante Δ N-FdhA1-U/C wurde ein geringer Teil des Proteins löslich exprimiert und konnte mittels Affinitätschromatographie an StrepTactin gereinigt werden. Da das Protein elektrophoretisch noch nicht ganz homogen war, wurde eine Ionenaustauschchromatographie an MonoQ angeschlossen. Das Protein eluierte nicht in einem Peak, sondern war in der Hälfte aller Fraktionen enthalten, was als Anzeichen dafür gewertet werden kann, dass auch das löslich exprimierte Δ N-FdhA1-U/C nicht korrekt gefaltet vorliegt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass auch FdhA1 in *E. coli* nicht als Selenoprotein exprimiert werden kann. Jedoch könnte überexprimiertes Protein zur Herstellung polyklonaler Antikörper verwendet werden. Dazu sollte Variante Δ N-FdhA1-U/C gewählt werden, da bei dem Einsatz von Antikörpern gegen dieses Protein keine zusätzlichen Kreuzreaktionen gegen FdhB1 und FdhB2 auftreten sollten. Für die Immunisierung eines Kaninchens werden größere Mengen homogenen Proteins (ca. 1 mg) benötigt. Daher bietet sich eine denaturierende Aufreinigung des unlöslich exprimiertes Δ N-FdhA1-U/C-Proteins an.

3.4 Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase aus *E. acidaminophilum*

Die Wolfram-haltige Formiat-Dehydrogenase wie auch die Aldehyd-Dehydrogenase (AOR) von *E. acidaminophilum* sind als extrem Sauerstoff-empfindlich beschrieben worden (GRANDERATH 1993). Bei früheren Anreicherungsversuchen konnte die Formiat-Dehydrogenase nicht homogen dargestellt werden. Da die AOR durch RAUH (2000) homogen gereinigt werden konnte und die für die Isolierung der AOR nicht verwendete Fraktion der Ammoniumsulfat-Fällung hohe FDH-Aktivität aufwies, wurde nach einigen Vorversuchen eine Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase durchgeführt.

Für die Anreicherung der AOR waren Zellen von *E. acidaminophilum* verwendet worden, die auf Serin/Formiat-Medium (40/30 mM) gewachsen waren, da diese die höchste spezifische Aktivität an AOR aufwiesen. Auch die Formiat-Dehydrogenase weist auf diesem Medium nach GRANDERATH (1993) mit 3,5 U/mg Protein mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor die höchste spezifische Aktivität auf.

Durch die Klonierung der Formiat-Dehydrogenase hatte sich gezeigt, dass *E. acidaminophilum* zwei *fdh*-Gensätze besitzt (s. 3.1.1). Nur die katalytische Untereinheit der FDH-I war bisher partiell gereinigt worden. Die höhere spezifische Aktivität der Formiat-Dehydrogenase im Rohextrakt von in Serin- und Se-

rin-Formiat-Medium gewachsenen Zellen im Vergleich zu Glycin- und Serin/Formiat/Betain (10/40/70 mM)-Zellen deutete auf die Expression beider Formiat-Dehydrogenasen hin. Wegen des erwarteten ähnlichen Aufbaus aus katalytischer Untereinheit FdhA und FdhB sowie der hohen Homologie der beiden Formiat-Dehydrogenasen zueinander war nicht auszuschließen, dass sich die beiden Proteine möglicherweise während der Aufreinigung derartig ähnlich verhalten könnten, dass am Ende eine Mischung beider Formiat-Dehydrogenasen erhalten würde.

3.4.1 Vorversuche zur Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase

Durch GRANDERATH (1993) war bereits bekannt, dass die Formiat-Dehydrogenase an Q-Sepharose bindet und sich ohne Verlust eluieren lässt. Auch durch Chromatographie an Phenyl-Sepharose wurden gute Anreicherungsfaktoren ohne große Verluste erreicht. Das Verhalten der Formiat-Dehydrogenase bei Chromatographie an Hydroxylapatit war uneinheitlich. Gelfiltration an Superdex 200 führte zu Aktivitätsverlusten von 90-98 % und sollte daher vermieden werden.

Da durch die Kombinationen dieser Materialien die Formiat-Dehydrogenase nicht homogen dargestellt werden konnte, wurden zunächst weitere Säulenmaterialien darauf getestet, ob sie die Formiat-Dehydrogenase zu binden vermögen.

Für die Vorversuche und auch für die spätere erste Anreicherung kamen die für die Anreicherung der AOR nicht verwendeten Fraktionen der Ammoniumsulfat-Fällung (bis 60 % AS) zur Anwendung (RAUH 2000). Diese wurden vereinigt und durch Dialyse entsalzt. Die erhaltene Fraktion enthielt noch 523 mg Protein, was 93 % des Proteingehaltes des Rohextraktes (aus 12 g Zellen) entspricht. Verwendet wurden zunächst Fertigsäulen (2 ml Bettvolumen) aus Sigma-Testkits. Dabei zeigte sich, dass die Formiat-Dehydrogenase bei 1 M Ammoniumsulfat an die hydrophoben Materialien Hexyl- und Octyl-Sepharose bindet und mit salzfreiem Puffer wieder eluiert werden kann. Von Decyl- und Dodecyl-Sepharose konnte die gebundene FDH-Aktivität auch mit 20 % Ethylenglycol nicht eluiert werden. Cibacron Blue war das einzige der getesteten Nukleotid-imitierenden Farbstoffmaterialien, das die FDH-Aktivität zu binden vermochte. Allerdings fand sich auch im Durchlauf Aktivität.

Die Formiat-Dehydrogenase von *E. acidaminophilum* besitzt mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor ein Temperaturoptimum von 60 °C (GRANDERATH 1993). Da auch bei der Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase aus *M. thermoacetica* (YAMAMOTO et al. 1983), die hohe Homologien zu denen aus *E. acidaminophilum* aufweist (s. 3.1.3), eine Hitzefällung verwendet wurde, wurde diese Methode für die Formiat-Dehydrogenase aus *E. acidaminophilum* getestet. Dazu wurden je 0,5 ml Probe in Hungate-Röhrchen bei 50, 60, 65 und 70 °C im Wasserbad für 3 bzw. 10 min schüttelnd inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt und ausgefallenes Protein durch Zentrifugation abgetrennt. Keine Aktivitätsverluste wurden bis 65 °C und 3 min festgestellt. Ab 65 °C und 10 min waren deutliche Aktivitätsverluste von 20 % zu verzeichnen. So wurden bei 70 °C/3 min und 70 °C/10 min nur noch 74 bzw. 29 % Restaktivität

gemessen. Der höchste Anreicherungsfaktor wurde für 65 °C/3 min mit 3,3 bestimmt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hitzefällung als Methode zur Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase durchaus in Frage kommt.

3.4.2 1. Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase

In dem für die erste Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase verwendeten Extrakt (vereinigte Fraktionen der Ammoniumsulfat-Fällung von 0 bis 60 %; RAUH 2000) befanden sich noch große Mengen an AOR-Aktivität. Daher wurde im ersten Schritt versucht, Formiat-Dehydrogenase und AOR voneinander zu trennen. Auf eine Hitzefällung wurde verzichtet, da die AOR unter den getesteten Bedingungen inaktiviert wurde (D. RAUH, persönliche Mitteilung). Als anaerober Basis-Puffer (Puffer A) diente 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, mit 10 mM Na-Azid, 2 mM Na-Dithionit und 2 mM DTT. Alle Schritte, soweit nicht gesondert erwähnt, wurden in einer Anaerobenbox bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach den Chromatographien wurde zunächst jede zweite bis vierte Fraktion per Mikrotiterschnelltest (mit Methylenblau als Elektronenakzeptor) auf FDH-Aktivität getestet. In den aktiven Bereichen wurden dann alle Fraktionen spezifisch mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor vermessen.

Als erstes Chromatographiematerial wurde Q-Sepharose gewählt. Der Extrakt wurde auf eine mit dem Puffer A äquilibrierten Q-Sepharose-Säule (35 ml Bettvolumen) aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit 105 ml Puffer A wurde ein NaCl-Gradient in Puffer A mit 250 ml von 0 bis 0,5 M und 100 ml von 0,5 bis 1 M angelegt. Die FDH-Aktivität eluierte in einem Peak zwischen 0,2 und 0,3 M NaCl. AOR-Aktivität konnte nicht mehr detektiert werden. Fraktionen, die FDH-Aktivität aufwiesen, wurden vereinigt und gegen Puffer A dialysiert. Nach Zugabe gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1 M und Zentrifugation zur Entfernung von Präzipitaten, wurde die Proteinlösung auf eine Octyl-Sepharose CL-4B-Säule aufgetragen. Die Säule mit einem Bettvolumen von 20 ml war zuvor mit 1 M Ammoniumsulfat in Puffer A äquilibriert worden. Die Säule wurde mit 60 ml des Äquilibrierungspuffers gewaschen und das Protein durch Anlegen eines abfallenden Ammoniumsulfat-Gradienten von 1 bis 0 M in einem Volumen von 250 ml eluiert. Da bis in die letzten Fraktionen noch FDH-Aktivität zu verzeichnen war, wurde noch einmal mit 40 ml Puffer A nachgewaschen. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und gegen Puffer A ohne Na-Dithionit, DTT und Resazurin dialysiert. Nach Äquilibrierung der MonoQ HR5/5-Säule mit dem gleichen Puffer, wurde die Enzym-Lösung aufgetragen, die Säule mit 10 ml des gleichen Puffers gewaschen und mit einem ansteigenden NaCl-Gradienten von 0,1 bis 0,5 M in einem Volumen von 20 ml eluiert. Die Formiat-Dehydrogenase eluierte bei 0,4 M NaCl in dem letzten und höchsten Peak. Die Hauptaktivität befand sich in den Fraktionen 30-33, die höchste spezifische Aktivität wies Fraktion 31 mit 988 U/mg auf. Mit der Aktivität ging eine intensive braune Färbung der Fraktionen einher.

Die aktiven und umliegenden Fraktionen wurden durch SDS-Gelelektrophorese analysiert. Dabei zeigte sich, dass das Intensitätsprofil von drei Banden identisch mit dem Profil der Aktivität waren. Neben der 98 kDa-Bande der katalytischen Untereinheit der Formiat-Dehydrogenase und der vermuteten zweiten 35 kDa-Untereinheit (FdhB) wurde eine dritte Bande bei 62 kDa identifiziert. Der Coomassie-Färbung nach zu urteilen, lag von dieser Proteinspezies die doppelte Menge im Vergleich zu FdhA und FdhB vor. Die Fraktionen 32 und 33 wiesen nur noch geringe Verunreinigungen durch andere Proteine auf. Die Fraktionen 30 und 34 wurden zur N-terminalen Sequenzierung der 98, 35 und 62 kDa-Banden verwendet (s. 3.4.4). Um festzustellen, ob das 62 kDa-Protein eine Untereinheit der aktiven Formiat-Dehydrogenase ist, wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Da bei früheren Gelfiltrationen von Formiat-Dehydrogenase große Verluste festgestellt wurden (GRANDERATH 1993), sollte nur die Hälfte der MonoQ-gereinigten Formiat-Dehydrogenase auf eine Gelfiltration aufgetragen werden, und der Rest durch Affinitätschromatographie an Cibacron Blue weiter aufgereinigt werden. Die aktivsten Fraktionen 31-33 wurden vereinigt und mit Microcon-Röhrchen auf 400 μ l eingeeengt.

Die Hälfte davon wurde auf eine Cibacron Blue-Säule (2 ml Bettvolumen) aufgetragen. Nach der Elution mit einem NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M war kaum noch Aktivität messbar. Daher wurden Aliquots der Fraktionen durch SDS-Gelelektrophorese analysiert, wobei sich zeigte, dass wieder die drei Banden in dem apparenten $\alpha\beta\gamma_2$ -Verhältnis vorlagen, aber noch durch weitere Banden verunreinigt waren. Außerdem „schmierte“ die Formiat-Dehydrogenase über die Säule, so dass sich dieses Material nicht für eine weitere Aufreinigung der Formiat-Dehydrogenase eignete.

3.4.3 Gelfiltration an Superdex 200

Der eingeeengte Pool nach der MonoQ (200 μ l) wurde auf eine FPLC-Superdex 200-Säule aufgetragen, die zuvor mit 150 mM NaCl in Puffer A ohne Na-Dithionit, DTT und Resazurin äquilibriert worden war. Nach der Trennung wurden zwei Peaks erhalten, die beide FDH-Aktivität zeigten. Der erste und höhere Peak eluierte nach 9,75 ml, entsprechend einer molekularen Masse von ca. 540.000 Da. Der zweite und wesentlich kleinere Peak (ca. 1/8 der Höhe des ersten Peaks) eluierte nach 12,5 ml, entsprechend einer molekularen Masse von ca. 230.000 Da.

Die Analyse der aktiven Fraktionen durch SDS-Gelelektrophorese zeigte deutlich, dass in allen Fraktionen, die dem ersten Peak entsprachen, wieder drei Proteinspezies enthalten waren. Auch war, wie bereits nach der Chromatographie an MonoQ beobachtet, das unbekannte Protein im Verhältnis zu den 98 und 35 kDa-Proteinen doppelt so stark gefärbt. Ein Verhältnis $(\alpha\beta\gamma_2)_x$ (98:35:62 kDa-Protein) angenommen, ergäbe sich bei $x = 2$ eine molekulare Masse von 514 kDa, was recht gut mit den bestimmten 540 kDa übereinstimmt. Auch in den Fraktionen des zweiten Peaks wurden die drei Proteinspezies gefunden, allerdings nicht mehr in dem Verhältnis $\alpha\beta\gamma_2$, was auf den Zerfall des aktiven Komplexes zurückzuführen sein könnte.

In den Fraktionen des ersten Peaks war die Formiat-Dehydrogenase elektrophoretisch homogen, außer den drei Proteinspezies waren keine kontaminierenden Banden mehr zu erkennen. Die Fraktionen 20-22 wurden vereinigt und für die Aufnahme eines UV-VIS-Spektrums und für die Elementanalyse eingesetzt (s. 3.4.5 und 3.4.6). In Tabelle 7 sind die wichtigsten Daten der ersten Anreicherung der FDH-II zusammengefasst, Abb. 3.12 zeigt ein SDS-Polyacrylamid-Gel der einzelnen Anreicherungsstufen.

Scheinbar traten wie schon bei GRANDERATH (1993) hohe Aktivitätsverluste während der Gelfiltration auf. Tatsächlich war aber bereits in dem Pool der MonoQ nach der Lagerung über Nacht auf Eis in der Anaerobenbox kaum noch Aktivität nachweisbar. Nach dem Gelfiltrationslauf wurde sogar mehr Aktivität wiedergefunden, als eigentlich aufgetragen wurde. Somit ist nicht die Gelfiltration problematisch für die Aktivität, sondern das angereicherte Protein *per se* in diesem Anreicherungszustand instabil. Mit zunehmender Reinheit reagiert die Formiat-Dehydrogenase auf Lagerungen sowohl bei 4 °C als auch bei -20 °C zunehmend mit Aktivitätsverlusten. Lagerungen sollten daher vermieden werden, bzw. so kurz wie möglich gehalten werden. Außerdem sollte den gelagerten Fraktionen DTT wieder zugesetzt werden.

Tabelle 7: 1. Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase (-II) aus *E. acidaminophilum*

	Aktivität [U]	Protein [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Anreicherungs- faktor	Ausbeute [%]
(NH₄)₂SO₄-Fällung¹	4539	523	8,7	-	-
Q-Sepharose	4424	89,5	49,4	5,7	97,5
Octyl-Sepharose	2196	5,28	415,9	47,8	48,4
Octyl-Sepharose (nach WE)²	1464	5,28	277,3	31,9	32,3
MonoQ	991	1,24	799,2	91,7	21,8
Gelfiltration³	59	0,31	190,3	21,9	1,3

¹ Fraktionen der Ammoniumsulfat-Fällung bis 60 %, enthielten 93 % des Proteins des Rohextraktes (RAUH 2000)

² Octyl-Sepharose-Pool wurde über das Wochenende bei -20 °C gelagert.

³ Für die Gelfiltration wurde nur die Hälfte des MonoQ-Pools verwendet.

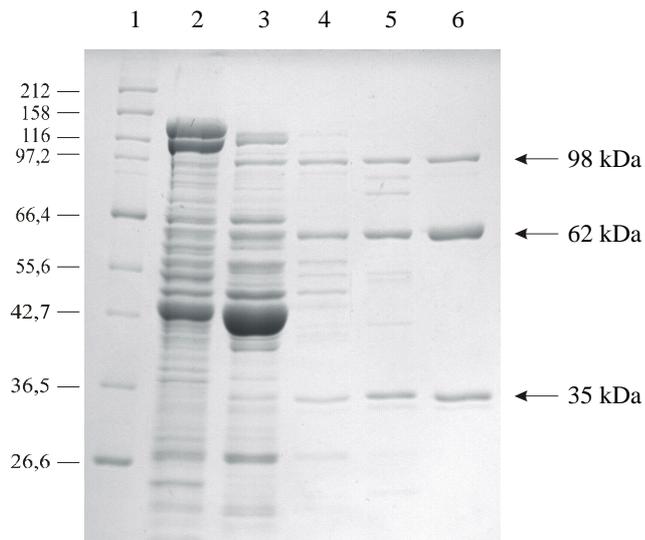


Abb. 3.12: Reinigung der Formiat-Dehydrogenase (-II) aus *E. acidaminophilum*. Dargestellt ist ein SDS-PAGE-Gel (10 %) mit verschiedenen, während der Anreicherung erhaltenen Fraktionen. Nach der Trennung wurden die Proteine mit Coomassie angefärbt. Die Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenase sind durch Pfeile gekennzeichnet. Spur 1 Molekulargewichtsmarker, die molaren Massen der Proteine sind in kDa angegeben, 2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung, 3 Q-Sepharose-Pool, 4 Octyl-Sepharose-Pool, 5 MonoQ-Pool, 6 Pool nach Gelfiltration

3.4.4 N-terminale Sequenzierungen

Zur Bestimmung der N-Termini wurden die Fraktionen 30 und 34 der MonoQ verwendet. Je 200 μl der Fraktionen wurden eingengt, durch SDS-Gelelektrophorese getrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet.

Identifizierung der 98 und 35 kDa-Proteine

Von den 98 und 35 kDa Proteinen wurden zur Überprüfung die ersten vier Aminosäuren bestimmt. Überraschend entsprachen die erhaltenen Sequenzen der FDH-II (98 kDa: Met-Ile-Asn-Val = FdhA2; 35 kDa: Met-Val-Thr-Leu = FdhB2).

Bei der Gelfiltration waren zwei Peaks erhalten worden, die FDH-Aktivität zeigten. Um auszuschließen, dass es sich bei dem zweiten Peak um die FDH-I handelte, wurde die 98 kDa-Bande der Gelfiltrationsfraktion 25 N-terminal sequenziert, sie entsprach aber ebenfalls FdhA2.

Das von GRANDERATH (1993) sowohl aus Serin/Formiat/Betain- (10/40/70 mM) als auch aus Serin/Formiat/Sarkosin-Zellen (10/40/60 mM) partiell gereinigte Protein entsprach in beiden Fällen der katalytischen Untereinheit der FDH-I (FdhA1). Daher stellte sich an diesem Punkt der Arbeit die Frage, ob in Serin-Formiat-Zellen nur Gensatz II exprimiert wird. Durch daraufhin durchgeführte semiquantitative RT-PCR-Experimente konnte festgestellt werden, dass in diesem Medium beide *fdh*-Gensätze in

etwa gleichen Mengen exprimiert werden (s. 3.1.9). Daher muss davon ausgegangen werden, dass FDH-I im Laufe der Anreicherung verloren gegangen ist. Nach der Chromatographie an Octyl-Sepharose wurde nur gut die Hälfte der aufgetragenen Aktivität wiedergefunden, möglicherweise war die FDH-I nach der Elution mit salzfreiem Puffer noch an das Material gebunden. Auch durch die Verwendung des Mikrotiterplatten-Schnelltests könnte die FDH-I abhanden gekommen sein. Möglicherweise unterscheiden sich die beiden Formiat-Dehydrogenasen in ihrer Reaktion mit Methylblau als Elektronenakzeptor, in einer neuen Anreicherung sollte daher auch in den Mikrotiterplatten-Tests Benzylviologen verwendet werden.

Identifizierung des 62 kDa-Proteins

Für die ersten 11 Aminosäuren des 62 kDa-Proteins wurde die folgende Sequenz bestimmt:

M D Y K N T I L V ? A

Diese Sequenz ergab keine Homologie zu Proteinen aus Datenbanken, stimmte allerdings mit dem N-Terminus von HymB komplett überein, anstelle des Fragezeichens befindet sich dort ein Cystein. HymB ist die elektronenübertragende Untereinheit der potentiell membrangebundenen Hydrogenase von *E. acidaminophilum*, die stromaufwärts des *fdh*-Gensatzes I codiert wird und ebenfalls in dieser Arbeit kloniert wurde (s. 3.1.4). HymB ist ein 64,8 kDa großes Protein und besitzt Motive für die Bildung von drei [4Fe-4S]- und einem [2Fe-2S]-Cluster, sowie für die Bindung von NADP und FMN (s. 3.1.5).

Eine 62 kDa-Bande war auch bei der partiellen Aufreinigung der FDH-I (GRANDERATH 1993) aufgetreten. Von dieser waren 25 N-terminale Aminosäuren bestimmt worden, von denen die ersten 14 ebenfalls der Sequenz von HymB entsprechen.

3.4.5 Aufnahme eines UV-VIS-Spektrums (1)

Die vereinigten Fraktionen der Gelfiltration wurden auf 500 µl eingengt. Zur Aufnahme des reduzierten Spektrums wurde das Enzym in der Anaerobenbox durch die Zugabe von Formiat reduziert (20 mM Endkonzentration) und die Küvette verschlossen. Nach 10 minütiger Inkubation wurde die Küvette aus der Box herausgeschleust und das Spektrum von 230 bis 800 nm aufgenommen. Anschließend wurde die Küvette geöffnet und ab und zu geschüttelt.

Im reduzierten Zustand zeigte sich ein extrem starker Peak bei 314 nm, der nach Inkubation mit Luft-Sauerstoff verschwand. Das gleiche Verhalten zeigte aber auch die Referenzprobe, die Puffer mit Formiat in gleicher Konzentration enthielt. Der Peak war leicht zu kürzeren Wellenlängen verschoben (Maximum bei 308 nm), und zeigte auch nur eine Absorption von 0,2, während die FDH-Probe eine unerklärbar hohe Absorption von 3 aufwies. Der Absorptionsunterschied der oxidierten und reduzierten Formiat-Dehydrogenase bei 314 nm sollte daher eine direkte Folge des Formiats sein. Warum die Absorption bei gleicher Menge Formiat aber in der FDH-Probe um den Faktor 15 erhöht ist, kann zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden. Da durch diesen Peak mögliche andere Signale verdeckt wurden, wurde bei der Aufnahme eines Spektrums nach der 2. Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase daher auf eine

Reduktion mit Substrat verzichtet (s. 3.4.9), in der Annahme, dass das Enzym durch das im Puffer enthaltene DTT ausreichend reduziert ist.

3.4.6 Elementanalyse durch Neutronenaktivierung

Durch die von Dr. D. Alber am Hahn-Meitner-Institut in Berlin durchgeführte Elementanalyse durch Neutronenaktivierung sollte festgestellt werden, ob und in welchen Konzentrationen die Elemente Wolfram, Molybdän, Selen und Eisen in der isolierten FDH-II enthalten waren. Obwohl bekannt war, dass NaCl, das noch zu 150 mM in dem Puffer enthalten war, die Elementanalyse insbesondere bei der Wolframbestimmung stört, wurde auf eine Dialyse verzichtet, da zu diesem Zeitpunkt keine Aktivität mehr messbar war und durch die Dialyse möglicherweise Wolfram oder Eisen verloren gegangen wäre.

Als Probe wurden 400 μ l der oxidierten Formiat-Dehydrogenase nach der Aufnahme des UV-VIS-Spektrums (ca. 0,13 mg Protein entsprechend ca. 0,5 nmol $\alpha\beta\gamma_2$ -Protomer) sowie der Laufpuffer der Gelfiltration (versetzt mit 20 mM Formiat) als Kontrolle nach Berlin geschickt. Durch die Analyse wurde nachgewiesen, dass die Probe Wolfram, aber kein Molybdän enthielt, Selen und Eisen wurden ebenfalls identifiziert. Zusätzlich wurde auch Zink, Cobalt und Chrom gefunden. Bedingt durch die störenden Einflüsse des Natriumchlorids sowie der geringen Konzentration der Proteinprobe, konnten keine sinnvollen stöchiometrischen Werte bestimmt werden.

3.4.7 2. Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase

Bei der zweiten Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase wurde verstärkt darauf geachtet, durch welchen Schritt die vom ersten *fdh*-Gensatz codierte Formiat-Dehydrogenase möglicherweise abgetrennt wird. Daher wurden alle Mikrotiterplattentests mit Benzylviologen durchgeführt, außerdem wurde die Octylsepharose-Säule mit 20 % Ethylenglykol nachgewaschen. Da bei der ersten Anreicherung das Protein nach der Chromatographie an MonoQ nahezu homogen war, wurde keine Gelfiltration durchgeführt, um größere Mengen aktiven Proteins zu erhalten. Mit dem im Zuge der 2. Anreicherung isolierten Protein sollte u.a. eine Pterinbestimmung durchgeführt sowie ein UV-VIS-Spektrum aufgenommen werden. Außerdem sollte die Fähigkeit der Formiat-Dehydrogenase nachgewiesen werden, neben der Formiat-Oxidation auch die Rückreaktion, die CO₂-Reduktion zu katalysieren. Bei einer genügend hohen Ausbeute sollten EPR-Messungen erfolgen. Während der Aufreinigung wurde bewusst auf Zusatz von Dithionit verzichtet.

Für die Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase wurde 45 g frisches Zellmaterial verwendet, das durch Anzucht in einem 100 l-Fermenter erhalten wurde. Die Fermentation wurde freundlicherweise von David Rauh durchgeführt. Der Organismus wurde auf 40 mM Serin-Medium angezogen, da normalerweise auf diesem Medium höhere Zelldichten im Vergleich zu Serin-Formiat-Medium bei gleichbleibender spezifischer FDH-Aktivität erreicht werden. Aus unbekanntem Gründen begann sich die Verdopplungszeit ab der 1 l-Vorkultur zu verlängern, so dass die 100 l-Kultur über drei Tage angezogen wurde. Die spezifische Aktivität der Formiat-Dehydrogenase war mit 0,7 U/mg im Rohextrakt niedriger als erwartet (3,2 U/mg; GRANDERATH 1993). Somit standen für die Anreicherung lediglich 2695 U zur Verfügung, weniger als bei der ersten Anreicherung.

Nach Zellaufschluss mittels French-Press und Zentrifugation wurde der Rohextrakt einer 60 %igen Ammoniumsulfat-Fällung unterzogen und das resuspendierte Protein über Nacht gegen Puffer B dialysiert. Es folgte eine Hitzefällung 10 min bei 60 °C, nach Pelletierung des denaturierten Proteins wurde der Überstand auf eine Q-Sepharose-Säule (Bettvolumen 50 ml) aufgetragen. Das gebundene Protein wurde mit 200 ml Puffer B gewaschen, und durch einen Gradienten von 0 bis 0,8 M NaCl in Puffer B in einem Volumen von 1 l eluiert. Die Fraktionen (je 6 ml) wurden mittels Mikrotiterschnelltest sowohl mit Benzylviologen als auch mit Methylenblau getestet, wobei kein Unterschied festgestellt werden konnte. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung auf 0,5 M Ammoniumsulfat eingestellt und auf eine auf 0,5 M Ammoniumsulfat äquilibrierte Octyl-Sepharose CL-4B-Säule (Bettvolumen 50 ml) aufgetragen. Das gebundene Protein wurde mit 150 ml 0,5 M Ammoniumsulfat in Puffer B gewaschen und anschließend mit einem Ammoniumsulfatgradienten von 0,5 bis 0 M in einem Volumen von 500 ml sowie weiteren 50 ml Puffer B eluiert. Eine danach noch vorhandene bräunliche Färbung des Säulenmaterials deutete auf noch gebundenes Protein hin. Daher wurde die Säule mit 150 ml Ethylenglykol (20 % in Puffer B) gewaschen, wobei auch das gefärbte Protein eluierte. FDH-Aktivität wurde allerdings nur in Fraktionen gefunden, die zwischen 0,35 und 0,2 M Ammoniumsulfat enthielten. Wie schon bei der ersten Anreicherung gingen wiederum mehr als die Hälfte der FDH-Aktivität während der Chromatographie an Octyl-Sepharose verloren.

Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, zwei Mal je eine Stunde gegen Puffer B dialysiert und auf eine MonoQ HR5/5-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 20 ml Puffer B gewaschen und das Protein mit einem NaCl-Gradienten von 0,1 bis 0,5 M in Puffer B eluiert. Die Hauptaktivität befand sich in drei Fraktionen. Die Analyse der aktiven und der umliegenden Fraktionen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte eine starke Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase des Gensatzes II mit den typischen drei Banden von 98, 62 und 35 kDa, im Hintergrund waren jedoch noch mehr Proteinbanden zu erkennen als nach der MonoQ-Chromatographie der ersten Anreicherung. Eine Bande von ca. 16 kDa korrelierte ebenfalls mit der FDH-Aktivität. Da dieses Protein nur kurz vor der Bromphenolblau-Bande lief, wäre es durchaus möglich, dass es auch bei der ersten Anreicherung aufgetreten war, aber übersehen wurde, weil es bereits aus dem Gel herausgelaufen war. Desweiteren wurde eine Bande von 83 kDa beobachtet, die nicht exakt mit der Aktivität korrelierte. Dabei könnte es sich um ein auch von GRANDERATH (1993) co-angereichertes Protein handeln. Das 98 kDa- sowie die 83 und 16 kDa-Proteine wurden N-terminal sequenziert (s. 3.4.8).

Die Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase ist in Tabelle 8 zusammengefasst. Die Tatsache, dass scheinbar nach der Chromatographie an MonoQ mehr Aktivität wiedergefunden als eingesetzt wurde, lässt sich durch eine Hemmung der FDH-Aktivität durch Ammoniumsulfat erklären. Sowohl im Pool nach der Ammoniumsulfat-Fällung als auch nach der Chromatographie an Octyl-Sepharose wurden nach Entfernung des Ammoniumsulfats durch Dialyse eine höhere FDH-Aktivität als vor der Dialyse bestimmt. Die spezifische Aktivität der aktivsten Fraktion der MonoQ-Chromatographie betrug mit 301 U/mg nur 30 % der höchsten spezifischen Aktivität der ersten Anreicherung von 988 U/mg (s. 3.4.2). Die theoretisch maximal erreichbare spezifische Aktivität dürfte noch höher liegen, da bei der ersten Anreicherung Aktivitätsverluste von 34 % durch 2-tägiges Einfrieren des Octyl-Sepharose-Pool auftraten. Wird dieser Verlust eingerechnet, könnten spezifische Aktivitäten von knapp 1500 U/mg erhalten werden.

Tabelle 8: 2. Anreicherung der FDH-II aus *E. acidaminophilum*

	Aktivität [U]	Protein [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Anreicherungs- faktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	2695	3770	0,7	-	-
Ammoniumsulfat-Fällung	2530	3625	0,7	0	93,9
Hitzefällung	1670	1680	1,0	1,4	62,0
Q-Sepharose	1550	360	4,3	6,1	57,5
Octyl-Sepharose	645	17	37,9	53,4	23,9
MonoQ	732	2,3	227,7	325,3	27,2

3.4.8 N-terminale Sequenzierungen (2)

Das 98 kDa-Protein wurde wie erwartet als FdhA2 verifiziert. Allerdings fanden sich geringe Spuren von FdhA1 (weniger als 5 %) in der Probe.

Wie bereits durch die erste Anreicherung gezeigt, wurde die FDH-II im Komplex mit einer Untereinheit der vom *hym*-Operon codierten Eisen-Hydrogenase HymB gereinigt. Daher war es nicht überraschend, dass es sich bei dem 16-kDa Protein um HymA handelt, einer weiteren Untereinheit der genannten Eisen-Hydrogenase. Sieben durch Edman-Abbau identifizierte N-terminale Aminosäuren (Met-Ala-Lys-Asn-Val-Phe-Thr) stimmten mit der aus dem *hymA*-Gen abgeleiteten Proteinsequenz vollständig überein. Auch die errechnete Größe (16,9 kDa) weicht kaum von der experimentell bestimmten ab. HymA wird wie auch HymB eine Funktion bei der Elektronenübertragung zugewiesen, es weist die konservierten Cysteine eines [2Fe-2S]-Zentrums auf (s. 3.1.5). Vermutlich wurde dieses Protein auch während der 1.

Anreicherung mit angereichert, dort aber übersehen, da bei den damals verwendeten 10 %igen SDS-PAGE-Gelen Proteine unter 20 kDa bereits aus dem Gel herausgelaufen waren. Möglicherweise war HymA auch in der homogenen Präparation enthalten, dies könnte durch eine erneute Anreicherung gezeigt werden.

Die durch Edman-Abbau erhaltene Sequenz des 83 kDa-Proteins (Met-Asp-Leu-Arg-Lys-Phe-Leu-Glu-Asp-Arg-Ile-Leu) weicht in den Positionen 4 und 10 von der des von GRANDERATH (1993) coangereicherten 83 kDa-Proteins ab. Anstelle der dort bestimmten Histidine wurden jetzt Arginine identifiziert. Bei Veränderung des pH-Wertes kann Arginin leicht als Histidin erkannt werden (K.P. RÜCKNAGEL, pers. Mitteilung). Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei dem im Laufe dieser Arbeit sowie dem von GRANDERATH (1993) gefundenen um das gleiche 83 kDa-Protein handelt.

3.4.9 Aufnahme eines UV-VIS-Spektrums (2)

Zur Aufnahme des Spektrums wurden 400 μl der Fraktion 31 der MonoQ-Chromatographie verwendet. Um störende Effekte durch Pufferbestandteile auszuschließen, wurde eine Basislinie aufgenommen. Die Proteinprobe wurde in der Anaerobenbox mit 100 μl des Elutionspuffers versetzt und in eine 500 μl -Quarzküvette gefüllt. Nach Aufnahme des ersten Spektrums (lila Spektrum in Abb. 3.13) wurde die Probe mit 5 μl 50 mM Natrium-Dithionit-Lösung versetzt, und nach 5 min ein weiteres Spektrum aufgenommen. Dabei zeigte sich abermals ein Peak bei 315 nm, wie schon bei der Reduktion durch Formiat (s. 3.4.5), der nach weiterer Inkubation (45 min) an Luft mit gelegentlichem Schütteln wieder verschwand. Stattdessen erschien eine Schulter im Bereich von 400 nm, die auf das Vorhandensein von Eisen-Schwefel-Zentren hindeutet (blaues Spektrum in Abb. 3.13). Mit Hilfe des für ein $\alpha\beta\gamma_2$ -FDH-Protomer anhand der Sequenz berechneten Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280} = 170.610 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ lässt sich die Konzentration der FDH-II bestimmen. Unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten des Ferredoxins von *C. pasteurianum* ($\epsilon_{390} = 30 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; RABINOWITZ 1972), das zwei [4Fe-4S]-Zentren enthält, lässt sich der Gehalt an Eisen auf 17 pro FDH-Protomer berechnen. Durch Sequenzmotive können für FdhA2 ebenso wie für FdhB2 vier [4Fe-4S]-, sowie ein [2Fe-2S]- und für HymB drei [4Fe-4S]-Zentren und ein [2Fe-2S]-Zentrum postuliert werden. Maximal könnten daher mit 64 Eisen pro Protomer viermal mehr Eisen zu finden sein, als über die Extinktion bei 390 nm berechnet wurde.

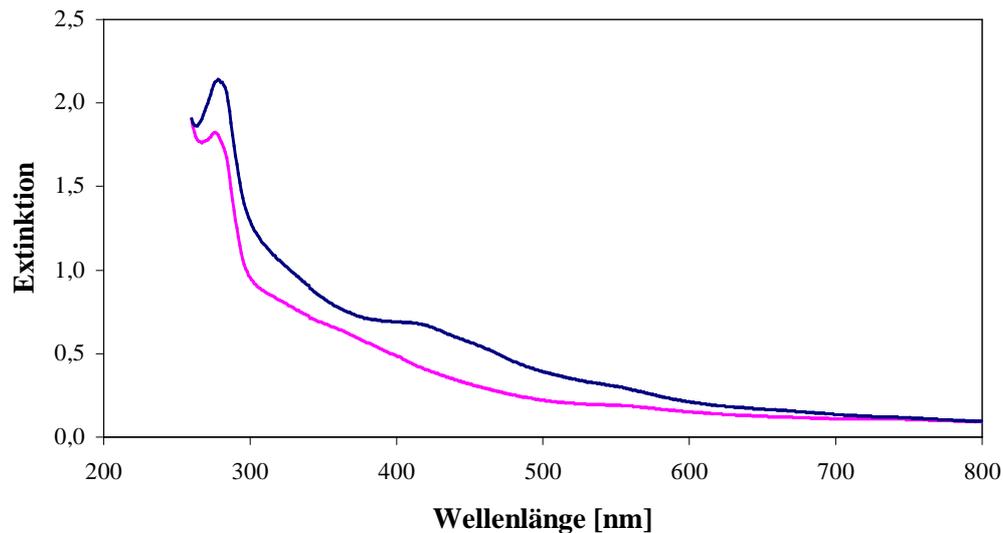


Abb. 3.13: UV-VIS-Spektrum der FDH-II im reduzierten (lila) und oxidierten (blau) Zustand

3.4.10 Identifizierung eines Pterin-Cofaktors

In allen Molybdän- oder Wolfram-haltigen Enzymen (mit Ausnahme der Nitrogenase) wird das Metallion durch einen Pterin-Cofaktor komplexiert. Dieser lässt sich durch Kaliumpermanganat im alkalischen Milieu zu Pterin-6-Carbonsäure oxidieren, wie für die Xanthin-Oxidase aus Buttermilch (JOHNSON UND RAJAGOPALAN 1982) und andere Molybdopterin-haltige Enzyme gezeigt wurde.

Für die Bestimmung wurden 400 μ l der MonoQ-Fraktion 32 nach Aufnahme eines Spektrums (zur Proteinbestimmung: 3,4 nmol FDH-Protomer $\alpha\beta\gamma_2$) eingesetzt. Als Standard diente Pterin-6-Carbonsäure. Die Maxima der Fluoreszenz-Spektren (Anregung und Emission) des Standards und der Formiat-Dehydrogenase entsprechen einander, der Anregungspeak bei 360 war bei der Formiat-Dehydrogenase allerdings um ca. 10 nm zu niederwelligeren Wellenlängen verschoben (Abb. 3.14). Mit Hilfe der relativen Fluoreszenz der Pterin-6-Carbonsäure lässt sich der in der Probe enthaltene Cofaktor quantifizieren. In der Probe waren ca. 0,45 nmol Cofaktor enthalten, es ergibt sich daher ein Verhältnis von 0,13 mol Pterin pro mol FDH-Protomer. Zu erwarten waren 2 pro Protomer, da bei allen bisher untersuchten Formiat-Dehydrogenasen und AORs zwei Cofaktormoleküle ein Molybdän bzw. Wolfram komplexieren.

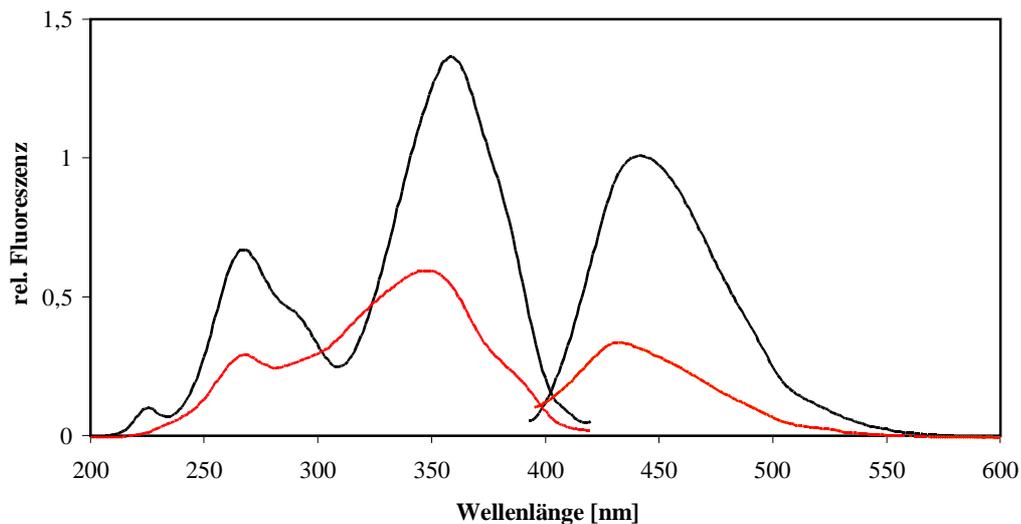


Abb. 3.14: Fluoreszenz-Spektrum des mit Kaliumpermanganat behandelten Pterin-Cofaktors der FDH-II von *E. acidaminophilum*. Als Standard ist das Spektrum von 1 nmol Pterin-6-Carbonsäure (schwarz) gezeigt, das Spektrum des Cofaktors der FDH-II ist rot dargestellt.

3.4.11 Versuche zur CO₂-Reduktion

Mit der partiell angereicherten FDH-I wurden Untersuchungen zur Reversibilität der FDH-Reaktion durchgeführt (GRANDERATH 1993). Dabei konnte für die CO₂-Reduktion eine spezifische Aktivität von 78 U/mg im Vergleich zu 322 U/mg für die Formiat-Oxidation bestimmt werden. Auf Grundlage des von GRANDERATH (1993) verwendeten Aktivitätstests wurden Messungen mit der gereinigten FDH-II durchgeführt.

Im Gegensatz zu der Formiat-Oxidation erwies es sich als vorteilhaft, die Reaktion statt mit Substrat- mit der Enzymzugabe zu starten. Als optimal erwies sich eine Methylviologen-Endkonzentration von 0,15 mM im Ansatz. Bei Einsatz von 1 µl Enzymlösung (Fraktion 30 der MonoQ) wurde eine maximale spezifische Aktivität von 11,5 U/mg bestimmt, die ca. 12 % der Formiat-Oxidation betrug, deren spezifische Aktivität mit Methylviologen auf 97 U/mg bestimmt wurde. Unter den untersuchten Bedingungen wurden durch Zusatz von Carboanhydrase, durch den die Konzentration an zur Verfügung stehendem CO₂ erhöht wird, nur geringfügig höhere Aktivitäten erreicht. Auch in Versuchen, bei denen keine Substratsättigung mehr vorlag (Einsatz von nur 10 statt 100 µl Substratlösung), hatte der Zusatz von Carboanhydrase keinen Einfluss.

3.4.12 Identifizierung der Pyruvat-Oxidoreduktase

Während der Chromatographie an Q-Sepharose wurde ein 130 kDa-Protein abgetrennt, von dem aufgrund der Größe vermutet wurde, dass es sich um Monomere der *surface layer* handeln könnte (s. 3.6.6.1). Auch lag dieses Protein zumindest nach Abschätzung der Bandenintensität im Coomassiegefärbten SDS-PAGE-Gel in großen Mengen vor. Die N-terminale Sequenz war nicht identisch zu der bereits zuvor bestimmten Sequenz des S-Layer-Proteins (s. 3.6.6.1), sondern wies hohe Ähnlichkeiten zu dem N-Terminus einer Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *C. pasteurianum* auf (Abb. 3.15), die mit 129,7 kDa eine nahezu identische Größe besitzt. Daher handelt es sich bei dem identifizierten 130 kDa-Protein aus *E. acidaminophilum* mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase. Eine Aktivitätsbestimmung wurde nicht mehr vorgenommen, da die Fraktionen bereits aerob waren. Die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *E. acidaminophilum* konnte aufgrund der Sauerstoff-Empfindlichkeit bisher nicht aufgereinigt werden (CLAAS 1991). Ausgehend von dem nun bekannten N-Terminus könnte das Gen kloniert werden.

```

130 kDa E.a.      AKVMKTMDGNTAAAH
PFOR C.p.      MAKIMKTMDGNEAAAY
                *:*****  ***

```

Abb. 3.15: Vergleich der N-terminalen Sequenzen des 130 kDa-Proteins aus *E. acidaminophilum* und der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *C. pasteurianum* (Acc. Nr. Y17726). Identische Aminosäuren sind durch einen Stern, ähnliche durch einen Doppelpunkt unterhalb des Alignments gekennzeichnet.

3.5 Nachweis einer Pyruvat-Formiat-Lyase im Genom von *E. acidaminophilum*

Die Assoziation von FDH-II mit Untereinheiten der Hydrogenase wäre sinnvoll, wenn Formiat beim Wachstum auf Serin als Intermediat entstehen würde. Wenn Pyruvat durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA umgesetzt wird, entstehen Reduktionsäquivalente, die entweder durch eine Wasserstoffentwicklung durch die Hydrogenase oder durch eine CO₂-Reduktion durch die Formiat-Dehydrogenase abgegeben werden können. Formiat-Dehydrogenase und Hydrogenase wären dann Konkurrenten um die Reduktionsäquivalente, eine Komplexbildung der beiden Enzymsysteme also nicht unbedingt logisch.

Ein anderes Bild ergäbe sich unter der Annahme, dass der Organismus eine Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) besäße. Dieses Enzym setzt Pyruvat redoxneutral zu Acetyl-CoA und Formiat um. Die bei der Oxidation des Formiats durch die Formiat-Dehydrogenase freiwerdenden Elektronen könnten direkt auf die assoziierte Hydrogenase übertragen werden, die dann Wasserstoff freisetzt.

Pyruvat-Formiat-Lyasen wurden bisher in verschiedenen anaeroben Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien nachgewiesen, so z. B. in *E. coli* (KNAPPE UND SAWERS 1990) und *C. pasteurianum* (WEIDNER UND SAWERS 1996). Am besten untersucht ist die Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) von *E. coli*. Die PFL ist ein Homodimer, bestehend aus zwei identischen 85 kDa-großen Untereinheiten. Die homolytische Spaltung der C-C-Bindung im Pyruvat erfolgt durch einen Radikalmechanismus. Das Enzym enthält ein Glycyl-Radikal, das durch ein 28 kDa-großes, Eisen-abhängiges PFL-aktivierendes Enzym (Act) gebildet wird (Übersichtsartikel: SAWERS 1999).

Zum Nachweis der PFL in *E. acidaminophilum* wurden degenerierte Primer von drei konservierten Regionen abgeleitet: einer N-terminalen Region 168-RGRIIGDY-175 (*pfl-1*), des katalytischen Zentrums 396-DDYAIACCV-404 (*pfl-2/pfl-2r*) und der C-terminalen, das Glycyl-Radikal tragenden Region 702-TIRVSGYAV-710 (*pfl-3*). Es wurden drei PCRs mit verschiedenen Primerpaarungen durchgeführt: *pfl-1/pfl-2r*, *pfl-2/pfl-3r* und *pfl-1/pfl-3r* (Abb. 3.16A). Als Template diente chromosomale DNA von *E. acidaminophilum*. In allen drei Fällen wurden PCR-Produkte in den erwarteten Größen erhalten (Abb. 3.16B). Durch Sequenzierung der PCR-Produkte wurde bestätigt, dass es sich um Amplifikate des *pfl*-Gens von *E. acidaminophilum* handelte.

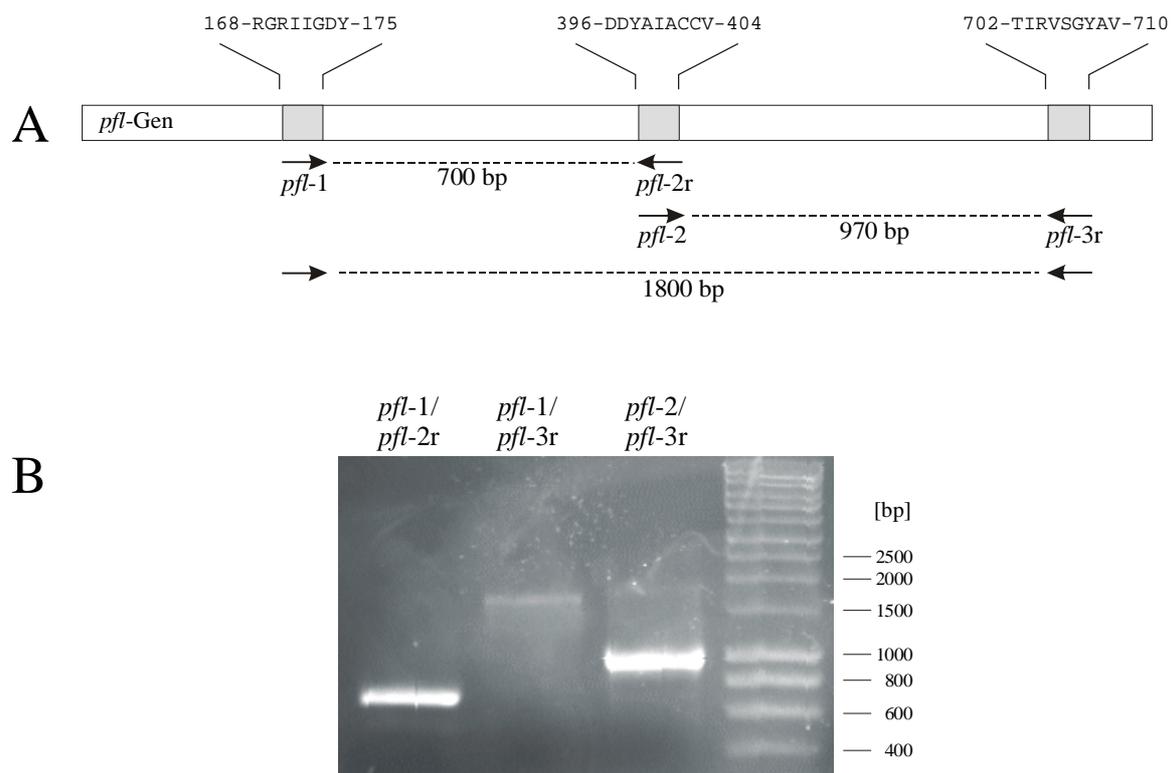


Abb. 3.16: Nachweis der Pyruvat-Formiat-Lyase mittels PCR. A: Schematische Darstellung des *pfl*-Gens, eingezeichnet sind die konservierten Domänen sowie die gewählten Primerpaarungen. **B:** 1 %iges Agarose-Gel mit den erhaltenen PCR-Produkten.

Somit wurde nachgewiesen, dass *E. acidaminophilum* über die genetische Ausstattung zur Bildung einer Pyruvat-Formiat-Lyase verfügt. Der Zusammenhang zwischen PFL und dem Komplex aus Formiat-Dehydrogenase und Hydrogenase ist dadurch aber noch nicht gezeigt. Dies könnte z. B. durch RT-PCR erfolgen, die PFL sollte auf Serin-Medium stärker exprimiert werden als auf Glycin-Medium.

3.6 Aufbau eines Transformationssystems für *E. acidaminophilum*

Für viele weitergehende Untersuchungen von Enzymsystemen aus *E. acidaminophilum* wie der in *E. coli* nicht aktiv exprimierbaren Formiat-Dehydrogenase, ist die genetische Manipulierbarkeit des Organismus eine unumgängliche Notwendigkeit. Erst dadurch könnten Funktionen unbekannter Gene geklärt, Regulationsmechanismen untersucht und komplex aufgebaute Proteine überexprimiert oder über Mutanten analysiert werden. Weder für *E. acidaminophilum*, noch für verwandte Organismen wie *C. sticklandii* oder *C. litorale* wurden bisher molekulargenetische Techniken entwickelt. Es existieren keinerlei Kenntnisse über verwendbare Resistenzen gegenüber Antibiotika oder über in diesen Organismen replizierfähige Plasmid-Origins. Daher sollte für *E. acidaminophilum* als Modellorganismus ein Transformationssystem entwickelt werden.

Die eleganteste und praktisch am einfachsten durchführbare Methode ist die Elektroporation, bei der durch einen Stromstoß Plasmide in die Zelle übertragen werden. Die Anwendung von Shuttle-Vektoren, die sowohl einen in *E. coli* replizierbaren ColE1-Origin als auch einen zweiten in Gram-positiven Bakterien replizierbaren Origin besitzen, erweist sich als vorteilhaft, da die Klonierungen in *E. coli* durchgeführt werden können, bevor die Übertragung in den gewünschten Organismus durch Elektroporation erfolgt. Die Voraussetzung zum Nachweis eines erfolgreichen DNA-Transfers ist hierbei die Replizierbarkeit des Plasmids in dem Bakterium, sowie die Selektierbarkeit gegenüber den nicht-transformierten Zellen in Form einer Antibiotika-Resistenz. Die Elektroporation wird für verschiedene *Clostridium*-Species wie *C. acetobutylicum* und *C. perfringens* bereits standardmäßig angewandt. Daher sollte zunächst versucht werden, diese Protokolle auf *E. acidaminophilum* zu übertragen. Verwendet wurden zunächst Plasmide, die auch in diese Organismen erfolgreich transformiert wurden.

Zu Beginn wurde das Wachstum von *E. acidaminophilum* auf festen Medien optimiert, sowie die Sensitivität von *E. acidaminophilum* gegenüber verschiedenen Antibiotika, für die potentielle Resistenzdeterminanten aus Gram-positiven Organismen zur Verfügung standen, auf Eignung untersucht.

3.6.1 Kultivierung von *E. acidaminophilum* auf festen Medien

Nach dem Ausstreichen geeigneter Verdünnungen einer frischen Übernachtskultur von *E. acidaminophilum* auf festes Medium waren die ersten runden und farblosen Kolonien von *E. acidaminophilum* nach 1½ - 2 tägiger Inkubation zu erkennen. Die Inkubation erfolgte dabei in einem Wittschen Topf unter Formiergasatmosphäre bei 30 °C auf MOPS-gepufferten Glycin-Medium, das als Reduktionsmittel 0,005 % Cystein enthielt. Bereits nach dieser Zeit wurden Kolonien unterschiedlichen Durchmessers beobachtet, wurden die Platten länger inkubiert, wuchsen die Kolonien bis zu einem Durchmesser von 0,5 cm, zusätzlich bildeten sich im Umfeld der ersten zu erkennenden Kolonien, vermutlich durch „Auschwärmen“ aus den älteren, neue Kolonien, was eine Auszählung der Kolonien erschwerte.

Zur Untersuchung des zur Koloniebildung befähigten Anteils der in Flüssigmedium gewachsenen Zellen, wurde die Gesamtzellzahl der Kultur durch eine Zellzahlbestimmung mittels Zählkammer ermittelt, sowie Verdünnungen der gleichen Kultur auf festen Medien ausgestrichen und nach zwei Tagen ausgezählt. Die Gesamtzellzahl der Glycin-Übernachtskultur ergab eine Anzahl von 3×10^8 Zellen pro ml, das Ergebnis des Auszählens der Kolonien (nur größere Kolonien wurden gezählt) wich mit 2×10^8 Zellen pro ml nur geringfügig davon ab, insbesondere, wenn man die ungenaue Auszählung der Kolonien berücksichtigt. Unter den untersuchten Bedingungen scheint daher der Großteil der *E. acidaminophilum*-Zellen zur Koloniebildung fähig zu sein.

3.6.2 Anzucht von *E. acidaminophilum* in Flüssigkulturen aus Kolonien

Notwendig für die Kultivierung von rekombinanten Klonen von *E. acidaminophilum* ist die Anzucht in Flüssigmedium, ausgehend von einer Einzelkolonie. Eine mit einer Kolonie von *E. acidaminophilum* angeimpfte 10 ml-Kultur im Hungate-Röhrchen bewuchs innerhalb von drei Tagen. Neben dem komplett anaeroben Vorgehen durch Überimpfen mittels Zahnstocher in der Anaerobenbox, konnte auch semi-aerob überimpft werden, indem die bewachsene Petrischale aus dem Wittschen Topf herausgeholt wurde, die gewünschte Kolonie in etwas Medium aufgenommen wurde und dieses dann in ein vorbereitetes Hungate-Röhrchen gespritzt wurde. Generell erwies sich *E. acidaminophilum* als weniger sauerstoffempfindlich als erwartet. Es gelang sogar, *E. acidaminophilum* aus drei Jahre alten aerob bei -20 °C gelagerten Zellpellets anzuziehen.

3.6.3 Untersuchung der Antibiotika-Sensitivität von *E. acidaminophilum*

Da Shuttle-Vektoren mit Erythromycin-, Chloramphenicol oder Tetracyclin-Resistenzdeterminanten zur Verfügung standen, wurde die Sensitivität von *E. acidaminophilum* gegenüber diesen Antibiotika in Flüssigkulturen und auf festen Medien untersucht.

Dazu wurden Hungate-Röhrchen mit Glycin-Medium, dem das jeweilige Antibiotikum in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt wurde (in einem Volumen von 100 μ l), mit einem 10 %igen Inokulum beimpft. Das Wachstum wurde über 2 Tage verfolgt. Für den Test auf festen Medien wurde ebenfalls Glycin-Medium verwendet, die zu untersuchenden Antibiotika wurden in einem Volumen von 100 μ l auf den Agarplatten ausgestrichen. Frühestens eine Stunde danach wurden die Platten aus einer frischen Flüssigkultur angeimpft, entweder durch Aufbringen eines Impfstrichs oder durch Ausplattieren einer geeigneten Verdünnung der Zellsuspension.

Erythromycin. *E. acidaminophilum* erwies sich als außergewöhnlich sensitiv gegenüber Erythromycin. In Flüssigmedium vertrug es Konzentrationen von 5 ng/ml. Auf festen Medien zeigte sich der Organismus noch empfindlicher, bei 125 pg/ml zeigte sich nur Wachstum an den Rändern, vermutlich bedingt durch die nicht gleichmäßige Verteilung des Antibiotikums, erst bei 12,5 pg/ml war auch das Zentrum der Platte bewachsen.

Chloramphenicol. Weit weniger empfindlich zeigte sich *E. acidaminophilum* gegenüber Chloramphenicol. Bei Konzentrationen von 2 μ g/ml Flüssigmedium wuchs er verlangsamt, erreichte aber die gleiche End-OD. Auch bei diesem Antibiotikum erwies sich *E. acidaminophilum* auf festen Medien als sensitiver als in Flüssigmedien, normales Wachstum wurde bei maximal 150 ng/ml erreicht.

Tetracyclin. In Anbetracht der Unterschiede zwischen den für feste und flüssige Medien erhaltenen Werten, wurde die Verträglichkeit von Tetracyclin nur auf festen Medien getestet, die zur Selektion nach einer Elektroporation benötigt werden. Bei Konzentrationen über 20 ng/ml wurde kein Wachstum von *E. acidaminophilum* festgestellt, bei 20 ng/ml wurden einige Kolonien in den Randbereichen erhalten, bei 2 ng/ml war keine Inhibierung des Wachstums zu beobachten.

3.6.4 Reinheitskontrolle mittels PCR bzw. Nachweis von Plasmiden in *E. acidaminophilum*

Da steriles Arbeiten in der Anaerobenbox nur bedingt möglich war, wurden neben mikroskopischen Kontrollen auch für *E. acidaminophilum* spezifische PCRs mit z. B. gegen *fdhA1* oder das *hym*-Operon

gerichteten Primern durchgeführt. Zellmaterial wurde mittels Zahnstocher in ein PCR-Reaktionsgefäß mit 50 µl H₂O überführt und zum Zellaufschluss 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die übrigen auf ein Volumen von 100 µl berechneten Bestandteile in weiteren 50 µl zugesetzt und die PCR durchgeführt.

Auf diese Weise wurden auch potentiell positiv-transformierte Klone auf die Anwesenheit eines Plasmids überprüft. Primerpaare liegen gegen die Erythromycin-Determinanten MLS^R (MLSA/B) und *ermBP* (*ermBP1/2*), sowie gegen *catP* (*catP1/P2*) und gegen *tetM* (*tetM-f/tetM-r*) vor.

3.6.5 Elektroporationsexperimente

Transformation durch Elektroporation erklärt man sich damit, dass durch das elektrische Feld die Membran destabilisiert wird, Poren entstehen, die DNA in die Zelle hereinlassen und sich dann wieder schließen. Es besteht daher auch die Gefahr, dass Zellen sterben, weil sich die Poren nicht mehr schließen können. Im Idealfall nimmt die Transformationseffizienz (Anteil der überlebenden Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben) mit abnehmender Überlebensrate zu. Bei der Transformation eines bis dato gentechnisch nicht manipulierten Organismus kann es verschiedene Gründe geben, warum nach einer Elektroporation keine Transformanten erhalten werden, so z. B., weil das Plasmid in dem neuen Wirt nicht repliziert oder die Resistenz nicht ausgeprägt wird. Einen Anhaltspunkt dafür, dass eine Elektroporation erfolgreich war, erhält man durch eine geringe Überlebensrate.

Bei Transformationen durch Elektroporation können sich wirtsspezifische Restriktionsendonukleasen als Hindernis erweisen, die die Transformationseffizienz wesentlich beeinflussen oder eine Transformation gänzlich verhindern können. Sind Endonukleasen vorhanden, können Plasmide durch *in vivo*- oder *in vitro*-Methylierung vor Abbau geschützt werden. Um die Barriere durch Endonukleasen von Anfang an zu vermeiden zu können, wurde *E. acidaminophilum* nach der Methode von SCHLEIF (1980) auf Restriktionsendonukleasen untersucht (s. 3.7.1). Die Restriktionsendonuklease *EacI* wurde angereichert und charakterisiert. Es zeigte sich aber, dass die von *EacI* erkannte Sequenz (5'-GGATC-3') mit der durch die *dam*-Methylase von *E. coli* geschützten Sequenz (5'-GATC-3') überlappt (s. 3.7.3). Plasmide, die aus *E. coli* XL1 Blue isoliert werden, sind daher vor Abbau durch *EacI* geschützt. Eine *in vivo* oder *in vitro*-Methylierung ist nicht notwendig.

Für erste Elektroporationsversuche wurde das für *C. acetobutylicum* DSM 792 entwickelte Versuchsprotokoll (NAKOTTE et al. 1998) als Grundlage verwendet. Eine 50 ml-Kultur wurde am Ende der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, die Zellen zweimal mit Elektroporationspuffer gewaschen und in 2 ml Elektroporationspuffer aufgenommen. Je 500 µl wurden dann mit ca. 0,5 µg Plasmid

versetzt, in eine gekühlte Küvette mit 4 mm Elektrodenabstand gegeben und einem Stromstoß ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen in Mini-Hungat-Röhrchen mit 2 ml Medium überführt, Proben zur Bestimmung der Überlebensrate entnommen und nach mindestens dreistündiger Inkubation bei 30 - 34 °C auf Selektionsmedium ausgestrichen. Die Auszählung zur Bestimmung der Überlebensrate erfolgte nach zwei Tagen, die Proben auf Selektionsmedium wurden mindestens eine Woche inkubiert.

Bei der Durchführung der Elektroporation wurden verschiedene Parameter variiert:

- Art des Waschpuffers; zur Anwendung kamen: 270 mM Saccharose mit oder ohne 5 mM Kalium-Phosphatpuffer; 10 % Glycerin mit und ohne 5 mM Kalium-Phosphatpuffer;
- die Feldstärke durch Änderung der angelegten Spannung von 1,0 – 2,5 kV; die Feldstärke variierte bei dem Einsatz von Küvetten mit 0,4 cm-Elektrodenabstand dementsprechend von 2,5 – 6,25 kV/cm;
- der Widerstand von 200 Ω bis $\infty \Omega$;
- Wahl des Plasmids; in den ersten Versuchsreihen eingesetzte Plasmide sind der Tabelle 9 zu entnehmen;
- Länge der Inkubation in Regenerationsmedium vor Aufbringen auf Selektionsmedium (3 Stunden bis über Nacht).

Tabelle 9: Shuttle-Vektoren, die für die Elektroporation von *E. acidaminophilum* verwendet wurden

Plasmid	Resistenzgen (<i>E. coli</i>)	Resistenzgen (Gram-positive)	Origin (<i>E. coli</i>)	Origin (Gram-positive)	Größe (kb)	Referenz
pIMP1	<i>bla</i> (Amp ^R)	MLS (Em ^R) ¹	ColE1 (pUC9)	pIM13 (<i>Bacillus subtilis</i>)	4,8	(1)
pIMP1:: <i>tetL</i>	<i>bla</i> (Amp ^R)	MLS (Em ^R) ¹ <i>tetL</i> (Tc ^R) ²	ColE1 (pUC9)	pIM13 (<i>Bacillus subtilis</i>)	6,8	(2)
pMTL500E	<i>bla</i> (Amp ^R)	<i>ermC</i> (Em ^R)	ColE1	pAM β 1 (<i>Enterococcus faecalis</i>)	6,43	(3)
pJIR418	<i>catP</i> (Cm ^R) <i>ermBC</i> (Em ^R)	<i>catP</i> (Cm ^R) <i>ermBC</i> (Em ^R)	ColE1 (pUC18)	pIP404 (<i>Clostridium perfringens</i>)	7,36	(4)
pJIR750	<i>catP</i> (Cm ^R)	<i>catP</i> (Cm ^R)	ColE1 (pUC18)	pIP404 (<i>Clostridium perfringens</i>)	6,57	(5)
pJIR751	<i>ermBC</i> (Em ^R)	<i>ermBC</i> (Em ^R)	ColE1 (pUC18)	pIP404 (<i>Clostridium perfringens</i>)	5,95	(5)
pSYL2	Tc ^R	MLS (Em ^R)	ColE1	pCBU2 (<i>Clostridium butyricum</i>)	8,7	(6)
pSYL7	Tc ^R	MLS (Em ^R)	ColE1	pJU122 (<i>Clostridium perfringens</i>)	9,2	(6)
pMS4	<i>tetM</i> (Tc ^R) ³	<i>tetM</i> (Tc ^R)	ColE1	pAM β 1 (<i>Enterococcus faecalis</i>)	10,99	(7)

¹ MLS: Resistenzdeterminante gegen Makrolide, Lincosamide und Streptogramin B auf pIM13

² *tetL*, aus Plasmid pMV158 aus *Streptococcus agalactiae*

³ *tetM*, von Tn916 aus *E. faecalis*

(1) MERMELSTEIN et al. 1992; (2) BÖHRINGER 1997; (3) OULTRAM et al. 1988; (4) SLOAN et al. 1992; (5) BANNAM AND ROOD 1993; (6) LEE et al. 1992; (7) STRÄTZ 1991

In keinem Fall wurden Transformanten erhalten. Die Überlebensrate jedoch war nahe 100 %, ein Hinweis darauf, dass die gewählten Bedingungen nicht ausreichten, um die Membran zu schädigen und DNA-Aufnahme zu erlauben.

Das erste Etappenziel war daher, Bedingungen zu finden, die ausreichen, um Zellen sterben zu lassen. Die Zellen wurden daher nur mit Wasser gewaschen und darin aufgenommen, statt der 4 mm-Küvetten wurden 2 mm-Küvetten verwendet, die eine Feldstärke von maximal 12,5 kV/cm zulassen. Trotzdem wurden weder Transformanten erhalten, noch zeigte sich eine reproduzierbare Abnahme der Überlebensrate. Für diese Experimente wurde nur noch pMS4 verwendet, da dieses Plasmid über eine Resistenz verfügt (*tetM*), die von sehr vielen Gram-positiven Organismen ausgeprägt wird, auch der Origin von pAM β 1 weist hinsichtlich der Replizierfähigkeit einen weiten Wirtsbereich auf.

3.6.6 Die *surface layer* als Elektroporationshindernis?

Die meisten aus ihrer natürlichen Umgebung isolierten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie Archaea besitzen eine *surface layer* (S-Layer), eine zweidimensionale parakristalline Schicht, die die Zelle komplett umhüllt, und den äußersten Abschluss der Zelle zu ihrer Umgebung darstellt. Die *surface layer* ist jeweils aus einer Sorte (Glyko-) Protein aufgebaut, zwischen den Proteinen befinden sich Poren mit einem Durchmesser von 2 – 8 nm, die Ausschlussgrößen zwischen 15.000 und 40.000 Da aufweisen (Übersichtsartikel: SÁRA UND SLEYTR 2000, SLEYTR UND BEVERIDGE 1999). Die Funktion der S-Layer ist noch nicht geklärt.

Sowohl *E. acidaminophilum* als auch *C. sticklandii* besitzen eine S-Layer. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Negativkontrastierungen der beiden Organismen, die freundlicherweise von Prof. F. Mayer aus Göttingen durchgeführt wurden, zeigten deutlich eine hexagonale S-Layer in *E. acidaminophilum* und eine quadratische S-Layer in *C. sticklandii*. Es liegt durchaus im Bereich des Möglichen, dass die S-Layer eine Übertragung von DNA durch Elektroporation verhindert. Supergecoilte Plasmide wie sie für Elektroporationen eingesetzt werden, sind vielleicht zu voluminös, um durch die Poren einer intakten S-Layer an die Cytoplasma-Membran zu gelangen, wo sie benötigt werden. Auch eine stromableitende Funktion der S-layer wäre denkbar, als Resultat erreichte der Strom nicht die Cytoplasma-Membran, wodurch sich die „Unsterblichkeit“ von *E. acidaminophilum* bei den durchgeführten Elektroporationsversuchen erklären ließe (s. 3.6.5). Wenn eine dieser Hypothesen zuträfe, müsste sich der Organismus wesentlich leichter manipulieren lassen, wenn man die S-Layer deletieren bzw. mutieren würde. Eine Voraussetzung dafür ist wiederum das Wissen um die Sequenz des S-Layer-Proteins. Das Protein wurde daher angereichert und N-terminal sequenziert, um anschließend das Gen klonieren zu können.

3.6.6.1 Anreicherung des S-Layer-Proteins

Die Anreicherung des S-Layer-Proteins von *E. acidaminophilum* erfolgte nach der von MESSNER UND SLEYTR (1988) beschriebenen Methode zur Extraktion der S-Layer-Proteine von Gram-positiven Bakterien. Verwendet wurden Zellen, die auf Glycin (50 mM) bzw. auf Serin/Formiat/Sarkosin (10/50/50 mM) gewachsen waren. Nach dem Zellaufschluss mittels French-Press wurde die cytoplasmatische Fraktion verworfen und die sedimentierten Zelltrümmer mit dem nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 zur Extraktion der Cytoplasma-Membran und der Membranproteine behandelt. Die auf diese Weise gewonnenen Zellwandfragmente sollten im Idealfall nur noch aus der Peptidoglycanhülle mit der aufgelagerten S-Layer bestehen. Die folgende Behandlung mit dem chaotropen Agens Guanidiniumhydrochlorid führte zur Dissoziation der S-Layer in die einzelnen Monomere, während die Peptidoglycanstruktur erhalten blieb und durch Zentrifugation abgetrennt wurde. Das Guanidiniumhydrochlorid wurde durch Dialyse gegen Wasser entfernt, wobei sich die Monomere wieder zu kristallinen Schichten zusammenlagern. Durch Sedimentation der Self-Assembly-Produkte des gereinigten S-Layer-Proteins erhält man im Idealfall homogenes S-Layer-Protein. Bei beiden Ansätzen von *E. acidaminophilum* war dies leider nicht der Fall, die unlöslichen Fraktionen waren alles andere als homogen. Hingegen waren in den löslichen Fraktionen nur noch zwei (Glycin) bzw. eine Bande (Serin/Formiat/Sarkosin) vorherrschend (Abb. 3.17). In beiden Ansätzen war eine Bande bei ca. 50 kDa zu erkennen, bei dem Glycin-Ansatz noch eine weitere bei ca. 130 kDa. Die N-terminale Sequenzierung der drei Proteine zeigte, dass die beiden 50 kDa-Proteine identisch waren, interessanterweise weist auch das 130-kDa-Protein den gleichen folgenden N-Terminus auf:

NH₂-A G P L T E G I E D S K V V K A ? E R L A ? F G I

Da die N-terminale Sequenz zur Klonierung des Gens nicht ausreichte (s. 3.6.6.3), wurden mit der löslichen Fraktion des Glycin-Ansatzes Versuche unternommen, um Hinweise zu erhalten, wie das Protein in größeren Mengen homogen gereinigt werden könnte. Nach einer Proteolyse könnten dann weitere Peptide N-terminal sequenziert werden. Die interessierenden 50 und 130 kDa-Proteine banden an Q-Sepharose und eluieren bei 0,5 M NaCl, die verunreinigenden Banden aber auch. Da insbesondere S-Layer-Proteine von Gram-positiven Organismen oftmals glykosyliert vorliegen, wurde getestet, ob das Protein an das Lectinmaterial ConA-Sepharose zu binden vermag, leider war dies nicht der Fall. Eine Trennung der Proteine wurde durch Zentrifugation in einem Saccharose-Glycerol-Dichtegradienten erreicht. Diese Methode trennt Proteine nach ihrer Größe, das 130 kDa-Protein ist daher relativ leicht abzutrennen. Für eine neue Anreicherung wäre daher eine derartige Zentrifugation vor dem Dialyseschritt denkbar, der Dichtegradient müsste dann ebenfalls Guanidiniumhydrochlorid enthalten.

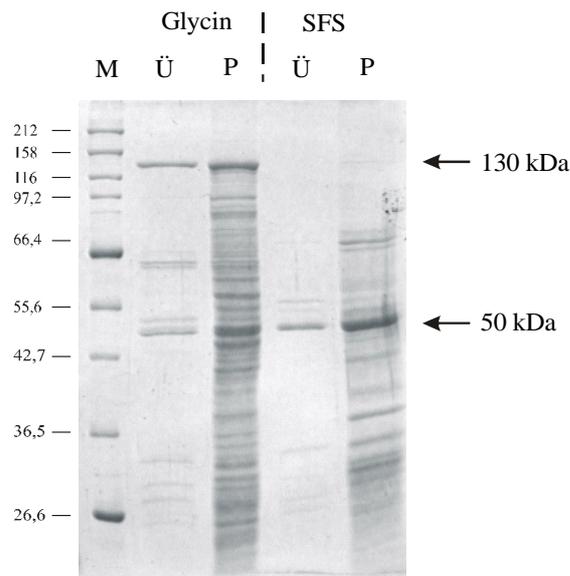


Abb. 3.17: Anreicherung von S-Layer-Proteinen von *E. acidaminophilum*. Verwendet wurden Glycin- und Serin/Formiat/Sarkosin (SFS)-Zellen. Dargestellt ist das SDS-PAGE-Gel (10 %) der beiden Fraktionen nach der Dialyse (Ü, Überstand; P, Pellet). Nach der Trennung wurden die Proteine mit Coomassie angefärbt. M, Molekulargewichtsmarker, die molaren Massen der Proteine sind in kDa angegeben.

3.6.6.2 Klonierung eines Proteins mit Ähnlichkeit zu S-Layer-Proteinen

Stromabwärts des *fdh*-Gensatzes II war in komplementärer Leserichtung ein offener Leserahmen identifiziert worden, der schwache Homologien zu *surface layer*-Proteinen aufwies (s. 3.1.2). Da das 5'-Ende des Gens auf diesem Plasmid nicht enthalten war, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesem offenen Leserahmen um das gesuchte *surface layer*-Gen handelte. Die vollständige Sequenz des Gens wurde durch PCR mit einem aus der bekannten Sequenz abgeleiteten Primer in Kombination mit universellen am Vektor bindenden Primern bestimmt (Abb. 3.18). Zwei derartige *anchored-ligation*-PCRs wurden nacheinander durchgeführt, als Template diente zunächst ein Ligationsansatz mit *HindIII*-Fragmenten, dann die λ -ZAP II-Phagenbank. Das erste PCR-Produkt wurde sequenziert und ein neuer Primer abgeleitet, nach erneuter Amplifizierung und Sequenzierung war das 5'-Ende des Gens identifiziert (die Sequenz ist im Anhang im Anschluss an den *fdh*-Gensatz II dargestellt). Das im weiteren *slpB* genannte Gen codiert für ein Protein, für das N-terminal eine Signalsequenz für den Transport über die Cytoplasma-Membran mit einer Spaltstelle zwischen Ala-31 und Ala-32 postuliert werden kann. Ohne diese Signalsequenz ist das Protein 89,9 kDa groß und weist im N-terminalem Bereich Homologien zu SLH-Domänen auf, die bei S-Layer-Proteinen und Exoproteinen vorkommen und mit der Bindung an sekundäre Zellwandpolymere in Verbindung gebracht werden (RIES et al. 1997).

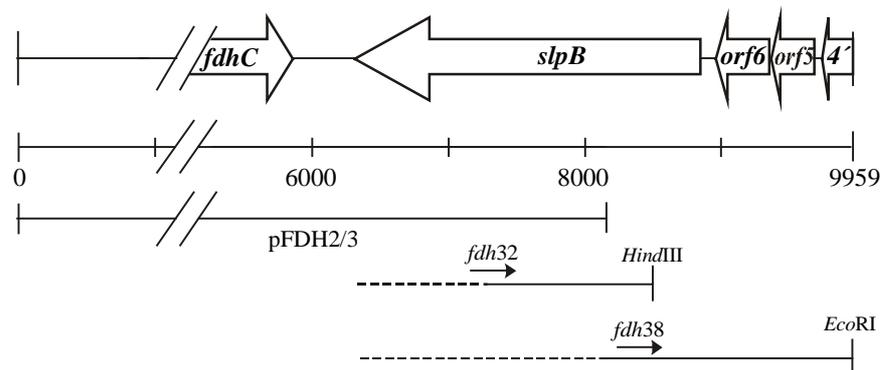


Abb. 3.18: Schematische Darstellung der *slpB*-Genregion stromabwärts des *fdh*-Gensatzes II. Unterhalb der Gene sind die in der *anchored ligation*-PCR amplifizierte Restriktionsfragmente eingezeichnet, sowie die dabei verwendeten Sequenz-spezifischen Primer.

Eine dem N-Terminus des isolierten S-Layer-Proteins entsprechende Sequenz konnte in der gesamten Proteinsequenz nicht gefunden werden. Bei dem klonierten Gen handelt es sich also nicht um das gesuchte S-Layer-Gen, sondern möglicherweise um ein weiteres, unter den untersuchten Bedingungen nicht exprimiertes S-Layer-Gen oder aber um ein Exoprotein. *SlpB* beginnt mit einem GTG-Startcodon, im Abstand von 8 bp befindet sich eine gut konservierte Ribosomenbindestelle. Die Codonnutzung weicht nicht auffallend von der in *E. acidaminophilum* üblichen ab (Tabelle 6), bei *slpB* könnte es sich durchaus um ein funktionales Gen handeln. Stromaufwärts von *slpB* befinden sich drei kleinere offene Leserahmen (Abb. 3.18), die keine signifikanten Homologien zu Proteinen aus Datenbanken aufweisen. *orf4* und *orf5* werden durch ein TGA-Codon getrennt. Da das TGA-Codon in *E. acidaminophilum* auch die Bedeutung als Selenocystein-Codon besitzt, könnten die von *orf4* und *orf5* umschlossenen Sequenz auch für ein unbekanntes Selenoprotein codieren. Ca. 30 bp stromabwärts des TGA-Codons folgt das erste von mehreren möglichen Startcodons von *orf5*, eine gut konservierte Ribosomenbindestelle befindet sich aber vor keinem. In einem für Redoxprozesse wirksamen Abstand von 4 bzw. 5 Aminosäuren vor bzw. hinter dem hypothetischen Selenocystein befinden sich zwei weitere Cysteine.

3.6.6.3 Klonierung des S-Layer-Gens *slpA*

Als Klonierungsstrategie wurde eine *anchored-ligation*-PCR gewählt, wie sie auch für die Klonierung von *slpB* angewendet wurde. Zwei verschiedene von der bestimmten N-terminalen Sequenz abgeleitete Primer (*slpA*-1 und *slpA*-2) wurden mit universellen, an den Vektoren bindenden Primern kombiniert, als Template dienten die zur Verfügung stehenden Genbanken von *E. acidaminophilum* sowie verschiedene

Ligationsansätze. Es wurden verschiedene PCR-Produkte erhalten und sequenziert, in keinem Fall konnte die sich dem Primer anschließende Sequenz identifiziert werden.

Für weitere Klonierungsversuche über PCR wäre es wünschenswert, wenn ein zweiter Primer direkt aus dem gesuchten Gen zur Verfügung stehen würde. Dazu müsste das Protein in ausreichender Menge isoliert werden, um Peptide herstellen zu können, und deren N-terminale Sequenz zu bestimmen. Eine andere Variante zur Identifizierung des gesuchten Gens wäre die Hybridisierung eines Southern Blots von *E. acidaminophilum* mit den markierten degenerierten Oligonucleotiden. Erhielte man spezifische Signale, könnte man mit dieser Sondenmischung die bestehenden Genbanken durchsuchen.

3.6.7 Konjugationsexperimente

Während es in der Literatur keine eindeutigen Hinweise darauf gibt, dass der gleiche Stamm einer Bakterienart sowohl eine S-Layer besitzt, als auch durch Elektroporation transformierbar ist, gibt es doch einige Berichte über DNA-Transfer in S-Layer-besitzende Bakterien mittels Konjugation. So konnte das konjugative Transposon Tn916 in viele Gram-positive Bakterien übertragen werden, auch in S-Layer ausprägende Organismen wie z. B. *C. difficile* (MULLANY et al. 1994) oder *Clostridium botulinum* (LIN UND JOHNSON 1991). Der natürliche Wirt von Tn916 ist *E. faecalis*, es vermittelt eine Tetracyclin-Resistenz, die von *tetM* codiert wird (FRANKE UND CLEWELL 1981).

Zur Konjugation standen zunächst zwei *E. coli*-Stämme zur Verfügung. Zum einen *E. coli* HB101 (pAM120), wobei auf pAM120 das Transposon Tn916 lokalisiert ist; zum anderen *E. coli* S17/1 (pKV12). pKV12 ist ein konjugatives Plasmid, das neben Replikationsursprüngen von pBR322 (ColE1-Origin) und pAM β 1 auch den Initiationspunkt des Transfers (*ori T*) des Inc-P-Plasmids RK2 enthält, zur Selektion dient die *tetM*-vermittelte Tetracyclin-Resistenz (STRÄTZ 1991). Das Plasmid kann durch die in S17/1 chromosomal vorhandenen Transferfunktionen (durch Integration eines RP4-Derivates) mobilisiert werden (SIMON et al. 1983).

Die Konjugation zwischen den *E. coli*-Stämmen und *E. acidaminophilum* wurde wie in 2.2.4 beschrieben durchgeführt. Die Transkonjuganten wurden gegen Tetracyclin selektiert, zunächst wurde eine Gegenselektion durch Zusatz von Colistin versucht, das spezifisch auf *E. coli* einwirken soll. Tatsächlich ist Colistin aber auch für *E. acidaminophilum* wirksam. Möglicherweise deswegen, weil auch *E. acidaminophilum* wie viele S-Layer-aufweisende Bakterien eine für einen Gram-positiven Organismus nur sehr dünne Peptidoglycan-Schicht besitzt. Colistin erhöht die Permeabilität der Membran, verursacht Lecks und führt so zum Zelltod. In weiteren Versuchen wurde daher nur durch das Medium auf *E. acidaminophilum* selektiert, in der Annahme, dass *E. coli* nicht auf Glycin-Platten wachsen kann. Bisher wurden keine Tetracyclin-resistenten Transkonjuganten erhalten.

Ein DNA-Transfer mittels Konjugation von Gram-negativen auf Gram-positive Bakterien wurde beschrieben, es mag aber Gram-positive Organismen geben, die dafür nicht geeignet sind. Daher sollte auch eine Konjugation zwischen zwei Gram-positiven Organismen getestet werden. Als Donor wurde *E. faecalis* (pAM211) ausgewählt. Auf dem Plasmid pAM211 ist das Transposon Tn916 lokalisiert. Die Durchführung der Konjugation erfolgte wie unter 2.2.4 beschrieben. Da *E. faecalis* auf Serin/Formiat/Glycin (40/30/20 mM)-Platten zu wachsen vermag, wurde dieses Medium für die Konjugation verwendet. Die Transkonjuganten wurden gegen Tetracyclin auf Glycin-Medium selektiert. Bisher konnten keine Transkonjuganten erhalten werden.

3.7 Untersuchungen zu Restriktionsendonukleasen von *E. acidaminophilum*

3.7.1 Test auf Anwesenheit von Restriktionsendonukleasen

Diese Methode nach SCHLEIF (1980) basiert auf einer Trennung der Restriktionsendonukleasen von unspezifischen Nucleasen durch Dextran-Polyethylenglycol-Phasentrennung. Die unspezifischen Nucleasen sind nach dem Zellaufschluss an die eigene DNA gebunden und werden in der Polymerphase gelöst, während die sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen an eigene DNA nicht binden können, da diese durch Methylierung geschützt ist, und daher im Überstand verbleiben. Durch Variation der Salzkonzentration während der Phasentrennung lassen sich die spezifischen und unspezifischen Nucleasen voneinander trennen.

Die Anwendung dieses Tests auf Rohextrakt von *E. acidaminophilum* wies auf das Vorhandensein von mindestens einer, möglicherweise auch zwei sequenzspezifischen Nucleasen hin, da sowohl mit niedrigen als auch mit hohen Salzkonzentrationen erhaltene Extrakte eingesetzte λ -DNA zu sich unterscheidenden Bandenmustern abbauten (Abb. 3.19). Die Reinheit der Extrakte reichte allerdings nicht aus, um die Schnittstelle der oder des Enzyms zu identifizieren. Bei der aus diesem Grund durchgeführten Anreicherung konnte eine Restriktionsendonuklease homogen dargestellt werden, die im weiteren *EacI* genannt wird.

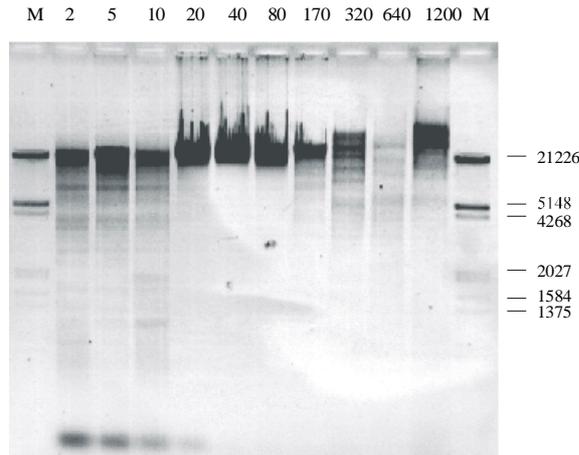


Abb. 3.19: Assay auf Restriktionsendonukleasen in *E. acidaminophilum*. Gezeigt sind die Restriktionsansätze, die mit den einzelnen Extrakten durchgeführt wurden, nach Trennung im Agarose-Gel. Die Extrakte unterscheiden sich durch die in dem Assay verwendeten Salzkonzentration, oberhalb jeder Spur ist die in diesem Ansatz eingesetzte Menge an 4 M NaCl verzeichnet. Die Größen des Standards (M) sind rechts in bp angegeben.

3.7.2 Anreicherung einer Restriktionsendonuklease aus *E. acidaminophilum*

30 g in Glycin-Medium gewachsene Zellen wurden in 50 ml Puffer D (10 mM Tris, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT) suspendiert. Die Herstellung des Rohextrakts erfolgte wie in 2.1 beschrieben. Zu Beginn der Anreicherung wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Zunächst wurde Ammoniumsulfat bis 20 % Sättigung zugegeben, das Pellet verworfen und die *EacI*-Aktivität durch Erhöhung auf 50 % Ammoniumsulfat quantitativ ausgefällt. Das Pellet wurde in Puffer D, der 100 mM NaCl enthielt, gelöst und gegen diesen Puffer dialysiert. Dem Dialysat wurden 15 ml des Affinitätsmaterials DNA-Cellulose zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert, anschließend durch Zentrifugation sedimentiert. Nach drei Waschschritten mit jeweils 30 ml Puffer E, wurde die Aktivität mit dreimal 10 ml 0,7 M NaCl in Puffer E eluiert. Die Überstände wurden vereinigt, gegen Puffer D dialysiert und auf eine Heparin-Agarose-Säule (Bettvolumen 28 ml) aufgetragen. Die Säule wurde mit 100 ml Puffer D gewaschen und das Protein mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M eluiert. Die *EacI*-Aktivität eluierte zwischen 0,5 und 0,6 M NaCl. Aktive Fraktionen wurden vereinigt, auf ca. 10 ml eingengt, gegen Puffer D dialysiert und auf eine FPLC-MonoQ HR5/5-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 ml 0,2 M NaCl in Puffer D gewaschen und mit einem linearen Gradienten von 0,2 bis 1 M NaCl eluiert. Die aktiven Fraktionen eluierten zwischen 0,55 und 0,65 M NaCl und wurden vereinigt. Analyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte, dass in dieser Fraktion nur noch zwei Proteine enthalten waren. Diese beiden Proteine konnten durch eine abschließende Gelfiltration an Superdex 200 voneinander getrennt werden. Nach Äquilibrierung der Säule mit 150 mM NaCl in Puffer D wurde die auf 0,2 ml eingengte Probe durch die Säule gespült. Die *EacI*-Aktivität eluierte in einem Volumen, das

einer molekularen Masse von ca. 65 kDa entsprach. Die aktive Fraktion der Gelfiltration enthielt elektrophoretisch sauberes *EacI*, Analyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte eine Einzelbande bei 65 kDa (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse von Gelfiltration und SDS-PAGE deuteten an, dass *EacI* monomer aufgebaut ist. Durch Klonierung des Gens wurde die experimentell bestimmte Größe bestätigt (s. 3.7.6).

Das Protein wurde N-terminal sequenziert, für die ersten 10 Aminosäuren wurde folgende Sequenz bestimmt:

H₃N-Val-Ala-Ile-Tyr- ? -Ile-Gly-Asn-Thr-Ser-Val

Aminosäure 5 konnte nicht bestimmt werden, der anstelle dieser Aminosäure erhaltene Peak entsprach keiner bekannten Aminosäure. Möglicherweise liegt Aminosäure 5 modifiziert vor. Die Sequenz wies keinerlei Homologien zu Proteinen aus Datenbanken auf.

3.7.3 Bestimmung der Erkennungssequenz von *EacI*

Um die Erkennungssequenz von *EacI* zu bestimmen, sollten Plasmide bekannter Sequenz mit dem Enzym geschnitten werden. Dabei zeigte sich, dass das Enzym nicht in der Lage war, aus *E. coli* XL1 Blue MRF' isolierte Plasmid-DNA zu schneiden. Insofern stellt dieses Enzym keine Barriere für eine Elektroporation dar. Die Unfähigkeit, *dam*- und *dcm*-methylierte Plasmide zu schneiden, war für die Ermittlung der Erkennungssequenz allerdings sehr hilfreich, da davon auszugehen war, dass die gesuchte Sequenz entweder mit der Erkennungssequenz der *dam*-Methylase (5'-GATC-3') oder mit der der *dcm*-Methylase (5'-CCWGG-3'; W = A oder T) überlappt. Durch den Verdau von (unmethylierten) PCR-Produkten, deren Sequenz bekannt war, konnte die Erkennungssequenz identifiziert werden: *EacI* erkennt die Sequenz 5'-GGATC-3' und ist damit ein Isoschizomer von *Ral8I* (*Ruminococcus albus* 8) und *AlwI* (*Acinetobacter lwoffii*). Prototyp dieser Gruppe ist *BinI* aus *Bifidobacterium infantis* (KHOSAKA UND KIWAKI 1984). Parallele Restriktionen von λ -DNA von *EacI* und *AlwI* bestätigten diese Annahme.

3.7.4 Bestimmung der Schnittstelle von *EacI*

Um die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *EacI* zu bestimmen, wurde ein "primer extension" vergleichbarer Ansatz gewählt. Ein durch Verwendung eines 5'-markierten Primers erhaltenes markiertes PCR-Produkt wurde mit *EacI* verdaut und anschließend parallel mit einer Sequenzreaktion, die mit dem gleichen markierten Primer durchgeführt wurde, auf einem Sequenzgel analysiert. Durch Fluoreszenzmarkierung des *sense*- bzw. *antisense*-Stranges kann man mit dieser Methode ermitteln, wo und mit welchem Überhang das Enzym sein Substrat relativ zu seiner Erkennungssequenz schneidet.

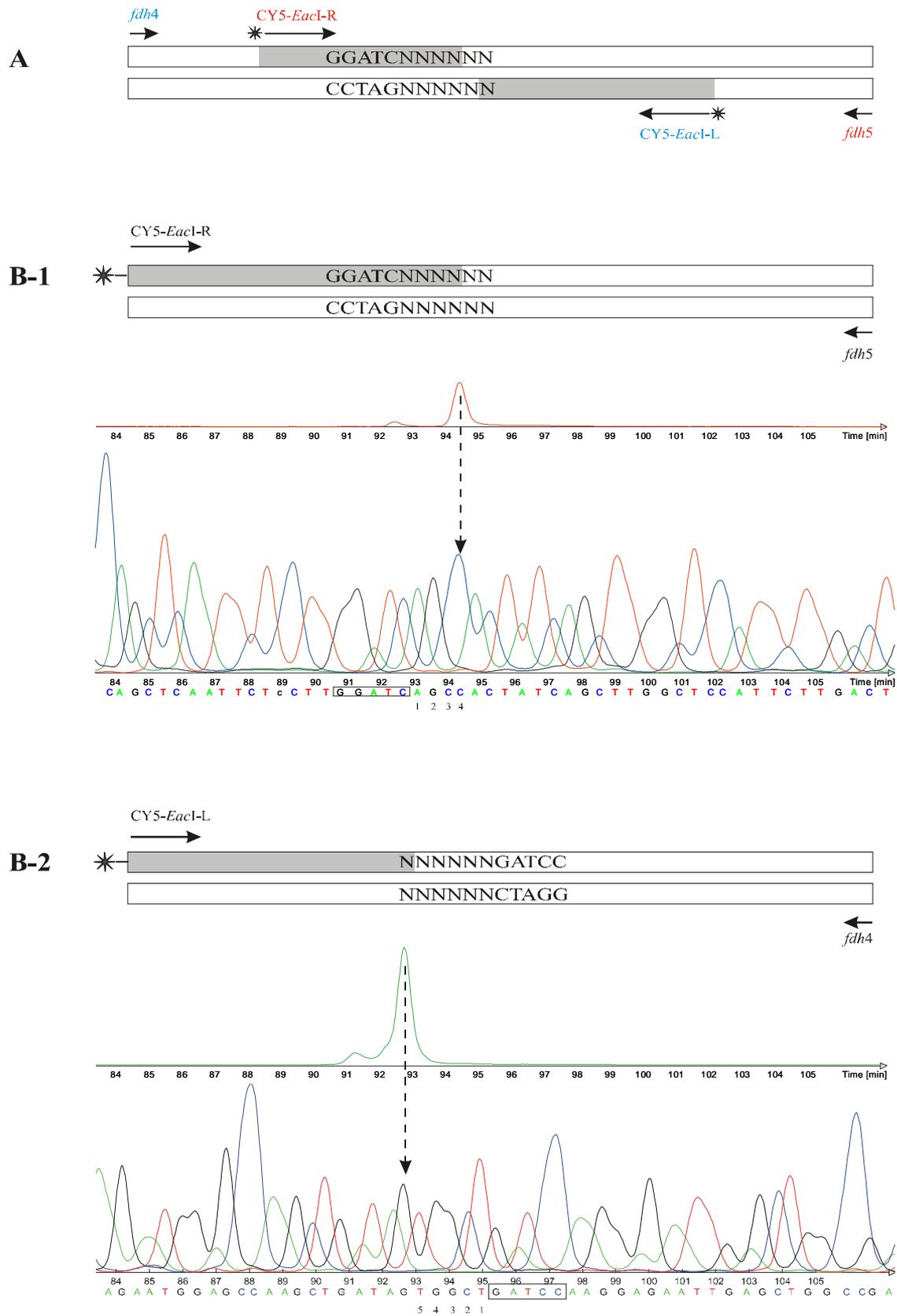


Abb. 3.20: Bestimmung der *EacI*-Schnittstelle. A: Darstellung der für die Bestimmung verwendeten PCR-Produkte, die zusammengehörenden Primer sind gleichfarbig dargestellt. **B:** Bestimmung der Schnittstelle im (1) Oberstrang bzw. (2) Unterstrang, die Signale der geschnittenen markierten PCR-Produkte ist der entsprechenden Base in der mit dem gleichen Primer durchgeführten Sequenzreaktion zugeordnet.

Die Schnittstellenbestimmung wurde zur Kontrolle parallel mit *AlwI* durchgeführt, das die gleiche Erkennungssequenz besitzt und dessen Schnittstelle bekannt ist. Es zeigte sich, dass *EacI* und *AlwI* echte Isoschizomere sind, d. h. sie erkennen und schneiden die gleiche Sequenz (Abb. 3.20, Abb. 3.21).



Abb. 3.21: Erkennungs- und Schnittstelle von *EacI*. Die Erkennungssequenz von *EacI* ist fett gedruckt, die Spaltstelle ist durch Pfeile angezeigt.

EacI ist damit in die zahlenmäßig noch relativ kleine Gruppe der Typ IIS Endonukleasen einzuordnen, die eine asymmetrische Erkennungssequenz besitzen und meist nicht innerhalb, sondern relativ zu dieser um einige Basen versetzt schneiden. Während Typ II Endonukleasen generell als Homodimer aktiv sind, sind Typ IIS Endonukleasen entweder heterodimer oder monomer aufgebaut. Die monomeren Restriktionsendonukleasen weisen dabei meist ca. die doppelte Größe auf, wie eine Untereinheit der dimeren Enzyme. Die Anreicherung von *EacI* weist darauf hin, dass dieses Enzym zu den monomeren Typ IIS Endonukleasen gehört (s. 3.7.2).

3.7.5 Klonierung und Sequenzierung des Methylase-Restriktase-Modifizierungssystems aus *E. acidaminophilum*

Bisher wurden erst wenige Typ IIS Endonukleasen eingehend charakterisiert, meist ist die Sequenz der Restriktionsendonukleasen nicht bekannt. Mit Hilfe einer eleganten und relativ einfachen Methode lassen sich Restriktionsendonukleasen klonieren, das homogene Enzym ist nicht notwendig. Die Methode beruht darauf, dass die Restriktionsendonuklease im Genom stets direkt benachbart der entsprechenden Methyltransferase lokalisiert ist. Die Klonierung erfolgt über die Aktivität der Methyltransferase, indem eine Plasmid-Genbank des entsprechenden Organismus mit dem Enzym komplett geschnitten wird. Eine Grundvoraussetzung für diese Methode ist daher, dass der für die Genbank verwendete Vektor durch das untersuchte Enzym geschnitten werden kann (der für die Plasmid-Genbank von *E. acidaminophilum* verwendete Vektor pUC18 weist 10 *EacI*-Schnittstellen auf). Plasmide, die in ihrem Insert die Methyltransferase codieren und diese in *E. coli* exprimieren, sind spezifisch methyliert und gegen die Restriktionsendonuklease resistent. Wird dieser Restriktionsansatz in *E. coli* rücktransformiert, erhält man im Idealfall nur Klone, die die Methyltransferase auf ihrem Insert tragen. Die Restriktionsendonuklease sollte sich dann stromauf- oder -abwärts des Methyltransferasegens befinden.

Da Plasmide gegen *EacI* geschützt sind, die aus *E. coli*-Stämmen isoliert wurden, die über die *dam*-Methylase verfügen, wurde die pUC18-Genbank von *E. acidaminophilum* zuerst in den Methyltransferase-defizienten *E. coli*-Stamm SCS110 transformiert. Die nunmehr isolierten Plasmide waren unmethyliert und wurden einem kompletten Restriktionsverdau mit *EacI* unterzogen und in *E. coli* XL1 Blue MRF' rücktransformiert. 10 Klone wurden ausgewählt, die Plasmid-DNA isoliert und in SCS110 transformiert. Die aus den rekombinanten SCS110-Klonen isolierte unmethylierte Plasmid-DNA wurde abermals mit *EacI* verdaut, zwei der untersuchten Plasmide erwiesen sich erneut als resistent gegenüber *EacI* und wurden mit Hilfe des „Genome Priming Systems“ GPSTM-1 sequenziert.

Das 2,7 kb-große Insert des Plasmides p*EacI*-1 enthielt erwartungsgemäß ein Gen, das Homologien zu Adenin-N⁶-methyltransferasen aufwies. Direkt stromabwärts des mit *meacI* bezeichneten Gens befand sich ein weiterer offener Leserahmen, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz mit dem N-Terminus des gereinigten *EacI* grob übereinstimmte. Anstelle des in der N-terminalen Sequenzierung an Position 4 gefundenen Tyrosins findet sich in der aus der Gensequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz ein Tryptophan. Die Aminosäure an Position 5, die zuvor nicht identifiziert werden konnte, erwies sich als Tyrosin. Auf p*EacI*-1 waren von *EacI* nur die ersten 83 Aminosäuren codiert, auch das mit einer von p*EacI*-1 abgeleiteten Sonde aus der λ -ZAP II-Phagenbank isolierte Plasmid p*EacI*-Ph5-1 vervollständigte *reacI* nicht komplett. Die Hybridisierung eines Southern Blots zeigte, dass die nächste *HindIII*-Schnittstelle ca. 800 bp stromabwärts lokalisiert war. *HindIII*-Fragmente von *E. acidaminophilum* wurden in pBluescript SK+ ligiert und dienten als Template für eine PCR mit dem Primer *EacI*-5 und universellen Primern. Das ca. 900 bp lange PCR-Produkt wurde direkt sequenziert und vervollständigte das *reacI*-Gen. Die komplette Sequenz ist in Abb. I.3 im Anhang zusammen mit den abgeleiteten Proteinsequenzen dargestellt.

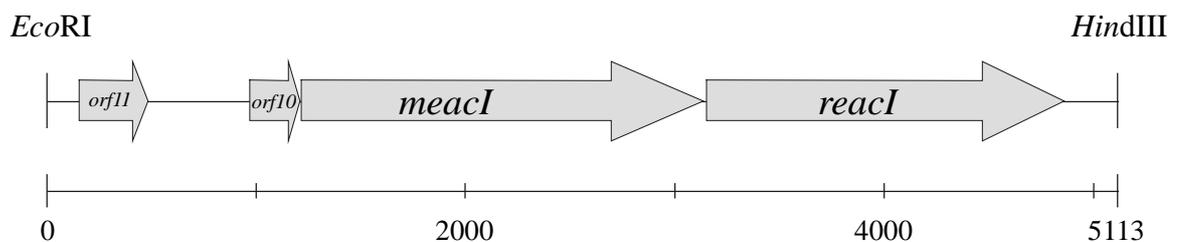


Abb. 3.22: Schematische Darstellung der *eac*-Genregion aus *E. acidaminophilum*.

Durch Röntgenstrukturanalysen der beiden Restriktionsendonukleasen *REcoRI* und *REcoRV* wurden vier Aminosäuren identifiziert, die am aktiven Zentrum der Enzyme beteiligt sind und dem Motiv PDX₁₉(D/E)XK entsprechen, die in Position 90 bzw. 73 beginnen. Durch Mutationsstudien wurde festgestellt, dass die positiven bzw. negativen Ladungen an den entsprechenden Positionen essentiell sind (ANDERSON 1993). Dieses Motiv wurde auch in anderen jedoch nicht in allen Sequenzen von Restriktionsendonukleasen gefunden, wobei der Abstand zwischen den beiden Teilmotiven variierte. In der ab-

geleiteten Aminosäuresequenz von *REacI* wurde ein ähnliches Sequenzmotiv (78-PEX₆DXR-87) identifiziert, das möglicherweise dem aktiven Zentrum von *REacI* entspricht.

Das Insert des zweiten Plasmids, das wie *pEacI-1* vor *EacI*-Verdau geschützt war, war 1552 bp groß und codierte für kein Protein mit Homologien zu Methyltransferasen. Stattdessen wurde auf diesem Plasmid ein Gen identifiziert, dessen Genprodukt hohe Homologien zu Ferredoxinen des Clostridien-Typs (STICHT UND ROSCH 1998) aufweist. Diese Ferredoxine besitzen zwei [4Fe-4S]-Zentren, die von zwei konservierten Cystein-Motiven (CxxCxxCxxxC) gebildet werden. Interessanterweise folgen in der Sequenz des Ferredoxins von *E. acidaminophilum* dem 4. Cystein beider Motive im Abstand von drei Aminosäuren ein weiteres Cystein, das bei allen anderen bekannten Ferredoxinen nicht konserviert ist. In der elektronenübertragenden Untereinheit HndC (HymB-Homolog) der zweiten Eisen-Hydrogenase von *E. acidaminophilum* (KEIL 1999) befindet sich bei einem [4Fe-4S]-Zentrum wie in dem Ferredoxin im gleichen Abstand ein 5. Cystein. Die Sequenz des *pFD-1* genannten Plasmids ist in Abb. I.4 in Anhang I dargestellt.

3.7.6 Charakterisierung der klonierten *eac*-Region

Die sequenzierte, durch die Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* begrenzte Region besteht aus 5113 bp und ist in Abb. 3.22 schematisch dargestellt. Stromaufwärts von *meacI* und mit diesem überlappend befindet sich der offene Leserahmen *orf10*, dessen abgeleitetes Proteinsequenz (76 Aminosäuren) Homologien zu dem hypothetischen Protein *YozG* von *B. subtilis* (Acc. Nr. Z99114) aufweist. Ein weiterer offener Leserahmen (*orf11*) befindet sich im Abstand von 595 bp stromaufwärts von *orf10*. Das abgeleitete Protein bestünde aus 111 Aminosäuren, und weist Homologien zu Endonuclease III auf, die aber wesentlich größer ist.

Das für *EacI* codierende Gen *reacI* beginnt mit einem GTG-Start- und endet mit einem TGA-Stopcodon. Stromaufwärts, im Abstand von 7 bp, befindet sich eine Purin-reiche Sequenz (5'-AGGGG-3'), die als Ribosomenbindestelle dienen könnte. Für den Translationsstart der Methyltransferase hingegen kommen zwei Codons in Frage, ein ATG-Codon (Base 1285, siehe Anhang) oder ein sich 18 bp stromabwärts befindendes TTG-Codon. Nur stromaufwärts des TTG-Codons kann eine Ribosomenbindestelle postuliert werden, so dass dieser Startpunkt der wahrscheinlichere ist. Das Gen endet mit einem TAA-Codon.

Der G+C-Gehalt von *reacI* und *meacI* erweist sich als sehr niedrig, so weist *reacI* einen Wert von 37,83 % und *meacI* 33,54 % auf, während der durchschnittliche G+C-Gehalt der bisher sequenzierten Bereiche 45,2 % beträgt. Diese Differenzen spiegeln sich auch in der Codonbenutzung wider, die Bevorzugung von Codons mit A oder T in der dritten Position ist bei *reacI* und *meacI* sehr stark ausgeprägt. Auffällig sind auch die Unterschiede bei Verwendung der Leucin-Codons, während „normalerweise“

TTA und TTG nur zu knapp 10 % gegenüber den CTN-Codons verwendet werden, machen sie in *meacI* und *reacI* mehr als 50 % aus. Auch der Anteil der einzelnen Arginin-Codons weicht stark von der üblichen Codonbenutzung ab. Die Codonnutzung der beiden Gene ist in Tabelle 6 mit der Codonnutzung anderer bekannter Gene aus *E. acidaminophilum* vergleichend dargestellt. Die Abweichungen in Codonnutzung und G+C-Gehalt weisen darauf hin, dass das Methylase-Restriktase-Modifizierungssystem möglicherweise durch horizontalen Gentransfer erworben wurde.

Die berechnete Größe von *EacI* (64,9 kDa bei 570 Aminosäuren) stimmt mit der experimentell durch Gelfiltration und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmten Größe von 65 kDa exakt überein (s. 3.7.2). Für *MEacI* (636 Aminosäuren) kann eine Größe von 72,8 kDa postuliert werden, wenn das TTG-Codon als Startcodon angenommen wird.

3.7.7 Überexpression von Methyltransferase und Restriktionsendonuklease in *E. coli*

Restriktionsendonuklease (*EacI*) und Methyltransferase (*MEacI*) wurden mittels *Strep*-tag-System in *E. coli* exprimiert. Dazu wurden die Gene in die *BsaI*-Sites der multiplen Klonierungsstelle des pASK-IBA7-Vektors kloniert. Die mit einem N-terminalen *Strep*-tag versehenen Proteine ließen sich in *E. coli* XL1 Blue MRF' exprimieren, die Ausbeute war allerdings bei Co-Expression der tRNA für die Arginin-Codons AGA/AGG stark erhöht. In beiden Fällen wurden die Proteine in *inclusion bodies* exprimiert. Nach Denaturierung der Proteine mit Guanidiniumhydrochlorid und anschließender *in-vitro*-Faltung konnte keine Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Erst durch Expression der Proteine in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL wurde ein Teil des Proteins löslich exprimiert und konnte durch Affinitätschromatographie an StrepTactin gereinigt werden. Für *MEacI* konnte eine spezifische Methylaseaktivität nachgewiesen werden, nachdem das Protein aufkonzentriert wurde (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass der Großteil des löslich exprimierten *MEacI* möglicherweise durch falsche Faltung der Polypeptidkette nicht aktiv war.

Aktives rekombinantes *EacI* konnte bisher nicht aus *E. coli* erhalten werden. Stämme, die den Expressionsvektor mit dem *reacI*-Gen enthielten, bildeten kleinere Kolonien und wuchsen langsamer, verglichen mit den entsprechenden *meacI*-Stämmen, obwohl der in diesem Expressionssystem verwendete *tet*-Promotor sehr "dicht" ist und *E. coli* durch die *dam*-Methylase gegen *EacI* geschützt sein sollte. Bei Expression von *EacI* in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL wurde ein kleiner Teil des Proteins löslich exprimiert, *EacI*-Aktivität konnte aber nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Aktivität der *dam*-Methylase nicht ausreichend, so dass aktiv exprimiertes *EacI*-Protein für *E. coli* toxisch ist. Eine Coexpression von *MEacI* und *EacI* könnte die Expression von aktivem *EacI* durch Schutz der *E. coli*-DNA vor Abbau fördern. Zur Expression beider Proteine wurde ausgenutzt, dass die Gene im Genom

von *E. acidaminophilum* gekoppelt vorliegen. Daher wurde der gesamte Bereich vom Methylase-Startcodon bis ein Codon vor dem Restriktase-Stopcodon mit entsprechend ausgewählten Primern amplifiziert und in pASK-IBA3 ligiert. Dieser Vektor führt zu einer C-terminalen *Strep-tag*-Fusion, so dass theoretisch beide Proteine exprimiert werden sollten, aber nur *REacI* über einen *Strep-tag* verfügt und über Affinitätschromatographie an StrepTactin gereinigt werden kann. Das Plasmidkonstrukt (pMREacI) wurde zur Expression in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert. Bei der Expression zeigte dieser Stamm keinerlei Wachstumsverzögerungen im Vergleich zu dem Stamm, in dem nur *REacI* exprimiert wurde. Daher ist davon auszugehen, dass aktives *EacI* exprimiert wurde, was zu den vorher beobachteten Wachstumseinschränkungen führte. Löslich exprimiertes *EacI*-Protein wurde gereinigt und auf Aktivität untersucht. Die eingesetzte Lambda-DNA wurde jedoch nicht spezifisch gespalten, sondern komplett abgebaut. Dieses Ergebnis lässt sich durch die Verunreinigung mit einer unspezifischen Nuklease erklären. Um diese von der Restriktionsendonuklease *EacI* abzutrennen, müsste sich mindestens ein weiterer chromatographischer Schritt anschließen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wolfram-abhängige Formiat-Dehydrogenase sowie eine Eisen-Hydrogenase des strikt anaeroben *E. acidaminophilum* auf Gen- und Transkriptionsebene untersucht und die FDH-II im Komplex mit einer Untereinheit der Hydrogenase biochemisch charakterisiert. Außerdem wurden Versuche zur Etablierung eines Transformationssystems für *E. acidaminophilum* durchgeführt.

Im folgenden wird der aus den Sequenzen abgeleitete Aufbau der Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenase und Hydrogenase diskutiert. Die Ergebnisse werden bezüglich der Funktion der Formiat-Dehydrogenasen im Stoffwechsel sowie der Interaktion mit elektronentransferierenden Proteinen insbesondere beim Wachstum auf Serin erörtert. Im weiteren wird versucht, die Funktion von Wolfram und Selen in der Formiat-Dehydrogenase zu erleuchten und diese in den Kontext einer CO₂-Reduktion zu stellen. Abschließend wird die Rolle der *surface layer* als Hindernis der Elektroporation von *E. acidaminophilum* diskutiert.

4.1 Klonierung der FDH-spezifischen Gensätze und Reinigung der FDH-II

In der vorliegenden Arbeit wurden die Strukturgene von zwei zueinander homologen Formiat-Dehydrogenasen im Genom von *E. acidaminophilum* identifiziert. Der *fdh*-Gensatz I codiert die bisher nur partiell gereinigte Wolfram-abhängige FDH-I (GRANDERATH 1993). Beide Operons weisen die Anordnung *fdhBA* auf. In den Genen der katalytischen Untereinheiten *fdhA1* und *fdhA2* konnte ein *in-frame* TGA-Codon identifiziert werden, so dass davon auszugehen ist, dass beide Formiat-Dehydrogenasen Selenoproteine sind. Die Gene *fdhB1* und *fdhB2* codierend für eine zweite vermutlich elektronentransferierende Untereinheit der Formiat-Dehydrogenasen.

Die durch den *fdh*-Gensatz II codierte FDH-II konnte im Verlauf der Arbeit aus Serin/Formiatgewachsenen Zellen homogen gereinigt werden. Der Wolfram- und Selen-Gehalt der FDH-II konnte mittels Neutronenaktivierung nachgewiesen werden, außerdem wurde Eisen identifiziert sowie geringe Mengen Zink, Cobalt und Chrom. In FDH-II konnte der Molybdopterin-Cofaktor nach Umsetzung zu Pterin-6-Carbonsäure nachgewiesen werden. Somit wird vermutlich auch in der Formiat-Dehydrogenase von *E. acidaminophilum* das Wolfram durch den Molybdopterin-Cofaktor komplexiert. Durch die Anreicherung der FDH-II wurde nachgewiesen, dass das durch *fdhB2* codierte Protein eine Untereinheit aktiver FDH-II ist. Ebenso wird eine Beteiligung des stromaufwärts von *fdhA1* codierten FdhB1-Proteins am Aufbau der FDH-I angenommen. Außerdem wurde in der homogenen Präparation der Formiat-Dehydrogenase eine dritte Proteinspezies gefunden, die als elektronentransferierende Untereinheit der vom *hym*-Operon codierten Eisen-Hydrogenase identifiziert wurde. Die FDH-II setzt wie auch FDH-I

Formiat mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor mit einer sehr hohen spezifischen Aktivität um, die höchste spezifische Aktivität wurde mit 988 U/mg gemessen. Unter Berücksichtigung der Aktivitätsverluste könnte eine maximale spezifische Aktivität von 1.500 U/mg erreicht werden. Neben der Formiat-Oxidation katalysieren beide Formiat-Dehydrogenasen auch die CO₂-Reduktion mit hohen Umsatzraten. Für FDH-II lief die CO₂-Reduktion mit 12 % der spezifischen Aktivität der Hinreaktion ab (s. 3.4.11), für FDH-I mit 24 % (GRANDERATH 1993).

Die Transkription beginnt für beide Gensätze stromaufwärts von *fdhB* und umfasst zusätzlich zu den Strukturgenen der Formiat-Dehydrogenase drei (Gensatz I) bzw. einen weiteren offenen Leserahmen (Gensatz II). So werden zusammen mit *fdhA1* und *fdhB1* auch Gene transkribiert, deren Produkte an der Synthese des Molybdopterin-Cofaktors beteiligt (*mog* und *mobA*) bzw. für die Aktivität von Formiat-Dehydrogenasen wichtig sind (*fdhD*). Der mit den Genen der FDH-II exprimierte offene Leserahmen (*fdhC*) codiert für ein Membranprotein, dessen Aufgabe vermutlich der Transport von Formiat ist. Durch Northern-Blot-Analysen und semi-quantitative RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass *fdh*-Gensatz I wahrscheinlich konstitutiv exprimiert wird, während Gensatz II ebenfalls konstitutiv, jedoch auf deutlich niedrigerem Niveau transkribiert und durch Serin (40 mM) induziert wird. Die Rolle der Formiat-Dehydrogenasen beim Wachstum von *E. acidaminophilum* auf verschiedenen Medien wird in 4.3 diskutiert.

Stromaufwärts des *fdh*-Gensatzes I ist das *hym*-Operon lokalisiert, das eine vermutlich Membran-assoziierte Eisen-Hydrogenase codiert. Das Operon besteht aus vier gemeinsam transkribierten Genen, wobei die katalytische Untereinheit von *hymC*, zwei elektronentransferierende Untereinheiten von *hymA* und *hymB* sowie ein putatives Membranprotein unbekannter Funktion von *hymD* codiert werden. In *E. acidaminophilum* liegt diese Hydrogenase, zumindest nach Isolierung aus Serin- bzw. Serin/Formiat-gewachsenen Zellen, assoziiert mit FDH-II vor. Die homogen gereinigte FDH-II enthielt neben FdhA2 und FdhB2 auch HymB, wobei dieses Protein nach Abschätzung der Bandenintensität im Coomassiegefärbten SDS-PAGE-Gel verglichen mit FdhA2 und FdhB2 in doppelter Menge vorlag. Die experimentell bestimmte molekulare Masse der FDH-II von ca. 540.000 Da stimmt gut mit der aus den Proteinsequenzen errechneten von 523.772 Da überein, bei Annahme eines Verhältnis der Untereinheiten FdhA1:FdhB1:HymB von 2:2:4. Eine weitere 16,9 kDa-große Untereinheit der Hydrogenase, HymA, wurde ebenfalls mit FDH-II angereichert. Dies wurde erst bei der zweiten Anreicherung bemerkt, die nach der Chromatographie an MonoQ beendet wurde. Ob dieses Protein auch in der homogenen Präparation nach der Gelfiltration vorliegt, muss eine erneute Anreicherung zeigen, die durch Gelfiltration bestimmte molekulare Masse der FDH-II deutet aber darauf hin.

Nach den Ergebnissen der semi-quantitativen RT-PCR werden die *fdh*-Gensätze I und II beim Wachstum mit Serin und Serin/Formiat auf vergleichbarem Niveau exprimiert. Demzufolge sollten FDH-I und FDH-II im Rohextrakt Serin- bzw. Serin/Formiat-gewachsener Zellen in vergleichbaren Mengen vorlie-

gen. Bei beiden durchgeführten Anreicherungen aus Zellen, die mit Serin- bzw. Serin/Formiat angezogen wurden, konnte am Ende jedoch nur FDH-II erhalten werden. Nach der zweiten Aufreinigung wurden bei der Überprüfung des N-Terminus des 98 kDa-Proteins geringe Spuren von FdhA1 gefunden (<5 %). Größere Aktivitätsverluste, die mit einer Abtrennung der FDH-I vereinbar wären, traten während beider Anreicherungen nur im Verlauf der hydrophoben Interaktions-Chromatographie an Octyl-Sepharose auf. Durch Nachwaschen der Säule mit 20 %igem Ethylenglykol wurde ein braun-gefärbtes Protein von der Säule eluiert, das jedoch keine FDH-Aktivität aufwies. Auch durch Analyse der entsprechenden Fraktionen im SDS-Gel konnte kein Protein bei 98 kDa identifiziert werden. Der Verbleib der FDH-I während der Anreicherung könnte eventuell geklärt werden, indem das Verhalten der FDH-Aktivität in Rohextrakt aus Glycin-gewachsenen Zellen, der nahezu keine FDH-II enthalten sollte, an Octyl-Sepharose getestet würde.

Da FDH-I bisher nicht homogen angereichert werden konnte, ist nicht bekannt, ob auch diese Formiat-Dehydrogenase mit der Hydrogenase assoziiert ist. Bei einer partiellen Anreicherung der FDH-I aus Zellen, die auf Serin/Formiat/Sarkosin gewachsen waren, wurde HymB ebenfalls mit gereinigt (GRANDERATH 1993). Dies könnte als Hinweis gedeutet werden, dass auch FDH-I mit der Hydrogenase assoziiert vorliegt. Genauere Aussagen können jedoch erst nach einer Anreicherung des homogenen Enzyms getroffen werden.

Im Gegensatz zur Aktivität im Rohextrakt reagierte die Aktivität der homogenen FDH-II auf Lagerungen relativ empfindlich, so waren z. B. nach 18-stündiger Lagerung bei -20 °C nur noch 30 % Restaktivität zu verzeichnen. Verschiedene Parameter können für diesen Aktivitätsverlust verantwortlich sein. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Ursache in dem nicht optimalen pH-Wert des Puffers zu suchen ist. Für die Anreicherung und Lagerung des Enzyms wurde der Puffer gewählt, in dem die Formiat-Dehydrogenase die höchste Aktivität aufwies, ein 50 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 8,0 (GRANDERATH 1993). Die Abhängigkeit der Stabilität des Enzyms vom pH-Wert dagegen wurde nicht bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass das pH-Optimum der Stabilität der Formiat-Dehydrogenase von *E. acidaminophilum* wesentlich von dem der Aktivität abweicht. Für Formiat-Dehydrogenasen aus *R. eutropha*, *E. coli* und *C. formicoaceticum* wurde beschrieben, dass sich das pH-Optimum der Stabilität im Vergleich zu dem der Aktivität bei wesentlich niedrigeren pH-Werten befand. Bei pH-Werten oberhalb von 8 nahm die Stabilität bereits deutlich ab (FRIEDEBOLD 1994; AXLEY et al. 1991, LEONHARDT UND ANDREESEN 1977). Aktivitätsverluste während der Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase von *E. acidaminophilum* traten dann auf, wenn die Lagerung des Enzyms zum „Schutz“ der Aktivität auf Eis, im Kühlraum oder bei -20 °C erfolgte, nicht jedoch während der Chromatographien bei Raumtemperatur. Gerade das verwendete Tris-Puffer-System reagiert aber stark temperaturabhängig ($\Delta\text{pK}_A/10\text{ °C} = 0,31$), so steigt der pH-Wert einer 50 mM Tris-HCl-Lösung von 8,0 auf 8,6, wenn die Temperatur von 25 °C auf 4 °C abgesenkt wird. Daraus kann geschlossen werden, dass die Aktivitätsverluste der Formiat-Dehydrogenase durch die Wahl eines anderen Puffersystems vermieden werden könnten. Zur weite-

ren Verwendung von Tris-Puffer sollte das Stabilitäts-pH-Optimum der Formiat-Dehydrogenase bestimmt und der pH-Wert des Puffers entsprechend angepasst werden. Außerdem sollte auf Temperaturveränderungen während der Reinigung verzichtet werden, zumal die Formiat-Dehydrogenase von *E. acidaminophilum* sehr Temperatur-unempfindlich ist. Zur Lagerung des homogenen Enzyms muss der pH-Wert exakt kontrolliert werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *E. acidaminophilum* zwei Wolfram- und Selen-abhängige Formiat-Dehydrogenasen besitzt, die beide neben der Formiat-Oxidation auch die Reduktion von CO₂ mit hohen Umsatzraten katalysieren können. Das Vorkommen von verschiedenen Formiat-Dehydrogenasen wurde auch für andere Organismen beschrieben, jedoch in keinem Fall die Ausprägung von Isoenzymen in Bezug auf Selen- bzw. Metall-Gehalt. Stattdessen sind die verschiedenen Formiat-Dehydrogenasen in unterschiedliche Stoffwechselflüsse eingebunden, wie dies auch in *E. acidaminophilum* der Fall zu sein scheint. So werden in *E. coli* die drei verschiedenen Formiat-Dehydrogenasen in Abhängigkeit des verfügbaren Elektronenakzeptors exprimiert (SAWERS 1994). Die beiden *fdh*-Operons in *W. succinogenes* sind hochkonserviert, nur zwei Basenpaare sind in den codierenden Genen ausgetauscht. Unterschiede weisen jedoch die Promotor-Regionen auf, so wird *fdhI* bei Anwesenheit der Elektronenakzeptoren Fumarat und Polysulfid exprimiert, während *fdhII* nur durch Polysulfid induziert wird (LENGER et al. 1997).

4.2 Aufbau und Redoxzentren von Formiat-Dehydrogenase und Hydrogenase

Bisher wurden keine EPR-spektroskopischen Untersuchungen mit der gereinigten Formiat-Dehydrogenase von *E. acidaminophilum* im Komplex mit HymB durchgeführt. Trotzdem können anhand von Homologien der Aminosäuresequenzen der Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenasen und der Hym-Hydrogenase von *E. acidaminophilum* zu entsprechenden Proteinen anderer Organismen, deren Struktur bereits aufgeklärt wurde, oder die mittels EPR-Spektroskopie untersucht wurden, Rückschlüsse auf die Redoxzentren der Proteine aus *E. acidaminophilum* gezogen werden.

Die katalytischen Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenasen lassen sich in zwei Gruppen einteilen, je nachdem, ob sie nur über ein [4Fe-4S]-Zentrum verfügen, wie FdhF von *E. coli*, oder vier weitere Eisen-Schwefel-Zentren besitzen, wie die beiden FdhA-Proteine von *E. acidaminophilum*, FdsA von *R. eutropha* oder FdhA von *M. thermoacetica* (s. 3.1.3, Abb. 3.2). Die Aminosäuresequenz der Formiat-Dehydrogenasen des längeren Typs läßt sich in zwei Bereiche unterteilen. Die N-terminalen 220 Aminosäuren weisen konservierte Cysteine auf (in Abb. 4.1B gelb dargestellt), die an der Ausbildung von Eisen-Schwefel-Zentren beteiligt sind. Der C-terminale Bereich ab Aminosäure 220 entspricht in seinem Aufbau den Formiat-Dehydrogenasen vom kürzeren Typ (grün dargestellt).

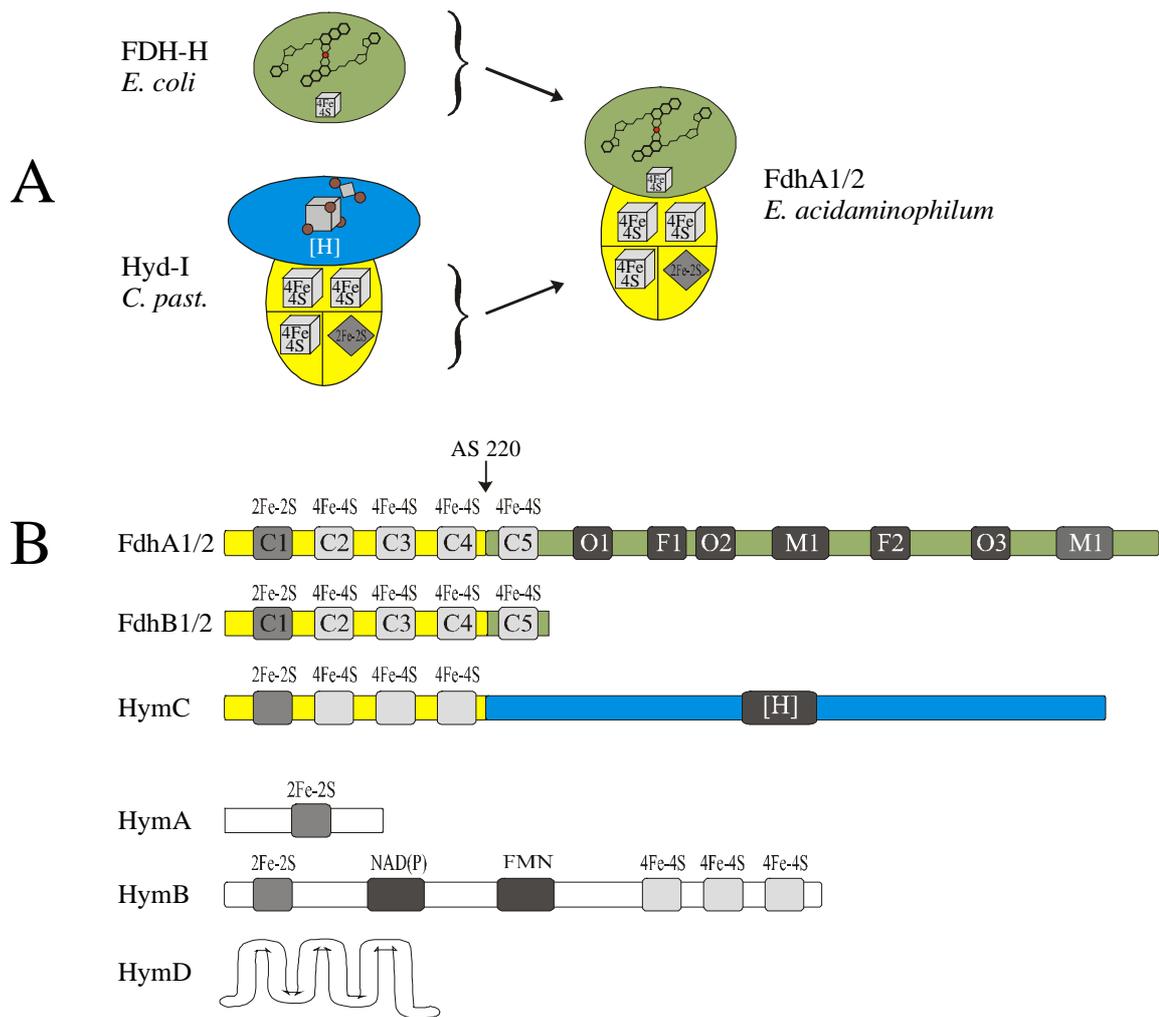


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der (A) dreidimensionalen Gestalt von FdhA1/2 von *E. acidaminophilum*, abgeleitet von den Strukturen der Formiat-Dehydrogenase-H von *E. coli* und der Hydrogenase von *C. pasteurianum*, sowie (B) der an Formiat-Dehydrogenase und Hym-Hydrogenase von *E. acidaminophilum* beteiligten Untereinheiten. In (A) ist die Unterteilung der Proteine in funktionale Domänen angedeutet, ebenso die redoxaktiven Zentren (MGD-Cofaktoren, Eisen-Schwefel-Zentren, [H]-Cluster). Bereiche mit Sequenzähnlichkeiten sind gleichfarbig dargestellt. Weitere Erläuterungen im Text.

Die Anordnung der Eisen-Schwefel-Cluster in der N-terminalen Extension taucht in den FdhB-Proteinen von *E. acidaminophilum* wieder auf, ebenso im N-terminalen Bereich der katalytischen Untereinheit der Eisen-Hydrogenasen (Abb. 4.1B). Auch HymC und HndC (KEIL 1999) von *E. acidaminophilum* weisen diese Anordnung auf. Die Primärsequenzen der entsprechenden Regionen weisen hohe Ähnlichkeiten zueinander auf. Beim Vergleich der N-terminalen 220 Aminosäuren zeigt HymC 44,2 % Identität zu FdhA2 und 44 % Identität zu FdhB2. Die Kristallstruktur der Eisen-Hydrogenase von *C. pasteurianum* wurde aufgeklärt (PETERS et al. 1998). Das Protein ist aus vier funktionalen Domänen in der dreidimensionalen Gestalt eines Champignons aufgebaut (Abb. 4.1A). Der „Schirm“ wird von einer voluminösen Domäne gebildet, die das aktive Zentrum, d. h. das [H]-Cluster beinhaltet und die den größten Teil des Proteins umfasst (Aminosäuren 220 bis 574). Die drei kleineren Domänen bilden den „Stiel“ und bein-

halten die vier Eisen-Schwefel-Zentren. Die direkt mit der [H]-Domäne interagierende Domäne enthält zwei Zentren vom [4Fe-4S]-Typ, wie sie auch in den clostridiellen Ferredoxinen vorkommen (STICHT UND ROSCH 1998). Die beiden anderen Domänen enthalten je nur ein singuläres Cluster vom [2Fe-2S]- bzw. [4Fe-4S]-Typ. Letzteres weist die Besonderheit auf, dass neben Cystein-Resten auch ein Histidin-Rest an der Ligation des Eisens beteiligt ist. Die Ähnlichkeit der N-terminalen Bereiche von Eisen-Hydrogenase und den N-terminal verlängerten Formiat-Dehydrogenasen lässt den Schluss zu, dass diese Formiat-Dehydrogenasen ebenfalls über ähnlich aufgebaute Eisen-Schwefel-Domänen verfügen. Die Tertiärstruktur der monomeren FDH-H von *E. coli*, dem Prototyp der Formiat-Dehydrogenasen des kürzeren Typs, wurde ebenfalls aufgeklärt (BOYINGTON et al. 1997). Es handelt sich um ein kompaktes globuläres Protein, das aus nur einer funktionalen Domäne besteht, die sich aus vier Strukturdomänen zusammensetzt (Abb. 4.1A).

Für FdhA1/2 und die anderen katalytischen Untereinheiten des längeren Typs kann daher postuliert werden, dass der C-terminale Teil (ab Aminosäure 220) in seiner dreidimensionalen Gestalt der FDH-H ähnelt, während sie drei zusätzliche Domänen besitzen, die von den N-terminalen 220 Aminosäuren gebildet werden und die den auch in der Eisen-Hydrogenase vorkommenden Eisen-Schwefel-Zentren-Domänen entsprechen. Sie sollten daher einen modularen Aufbau aus vier funktionalen Domänen aufweisen, wobei die „vierte“ Domäne einer monomeren Formiat-Dehydrogenase wie FDH-H von *E. coli* entspricht (Abb. 4.1A). Diese umfasst den größten Teil des Proteins und beinhaltet das katalytische Zentrum, zwei MGD-Cofaktoren sowie ein [4Fe-4S]-Zentrum.

Vier Cysteine im N-terminalen Bereich von FDH-H von *E. coli* bilden ein [4Fe-4S]-Zentrum aus, über das alle Formiat-Dehydrogenasen verfügen (C5, Abb. 4.2). Die beiden Molybdopterin-Guanin-Cofaktoren (MPT 801 und MPT 802 bei FDH-H von *E. coli*) werden über Wasserstoff-Brücken-Bindungen sowie ionische und hydrophobe Wechselwirkungen an das Protein gebunden. An der Bindung der Cofaktoren sind 35 Aminosäuren beteiligt, von denen bei 12 die Wechselwirkungen vom Peptidrückgrat ausgehen, und dementsprechend keine hohe Konservierung aufweisen. Die restlichen Aminosäuren bilden die Wasserstoff-Brücken ausgehend von ihren Seitenketten und sind, wie in Abb. 4.2 gezeigt ist, in FdhA1 und FdhA2 konserviert oder durch Aminosäuren ausgetauscht, die die gleiche Funktion übernehmen können.

Charakteristisch für Formiat-Dehydrogenasen sind die Aminosäuren His-141 und Arg-333 (Nomenklatur nach FDH-H von *E. coli*), die direkt im aktiven Zentrum lokalisiert sind, und vermutlich auch im Katalysemechanismus eine Rolle spielen.

Der von BOYINGTON et al. (1997) vorgeschlagene Reaktionsmechanismus (Abb. 4.3) wird durch Arbeiten von KHANGULOV et al. (1998) unterstützt. Ein 6-fach koordiniertes Molybdän in der Oxidationsstufe +VI sowie ein oxidiertes [4Fe-4S]-Zentrum liegen im Ausgangszustand der FDH-H von *E. coli* vor. Die Liganden des Molybdäns werden von den vier Dithiolen-Schwefel-Atomen der beiden Cofaktoren, dem Selen des Selenocysteins-140 sowie vermutlich einem Hydroxid-Ion gestellt. Dieses Hydroxid-Ion wird

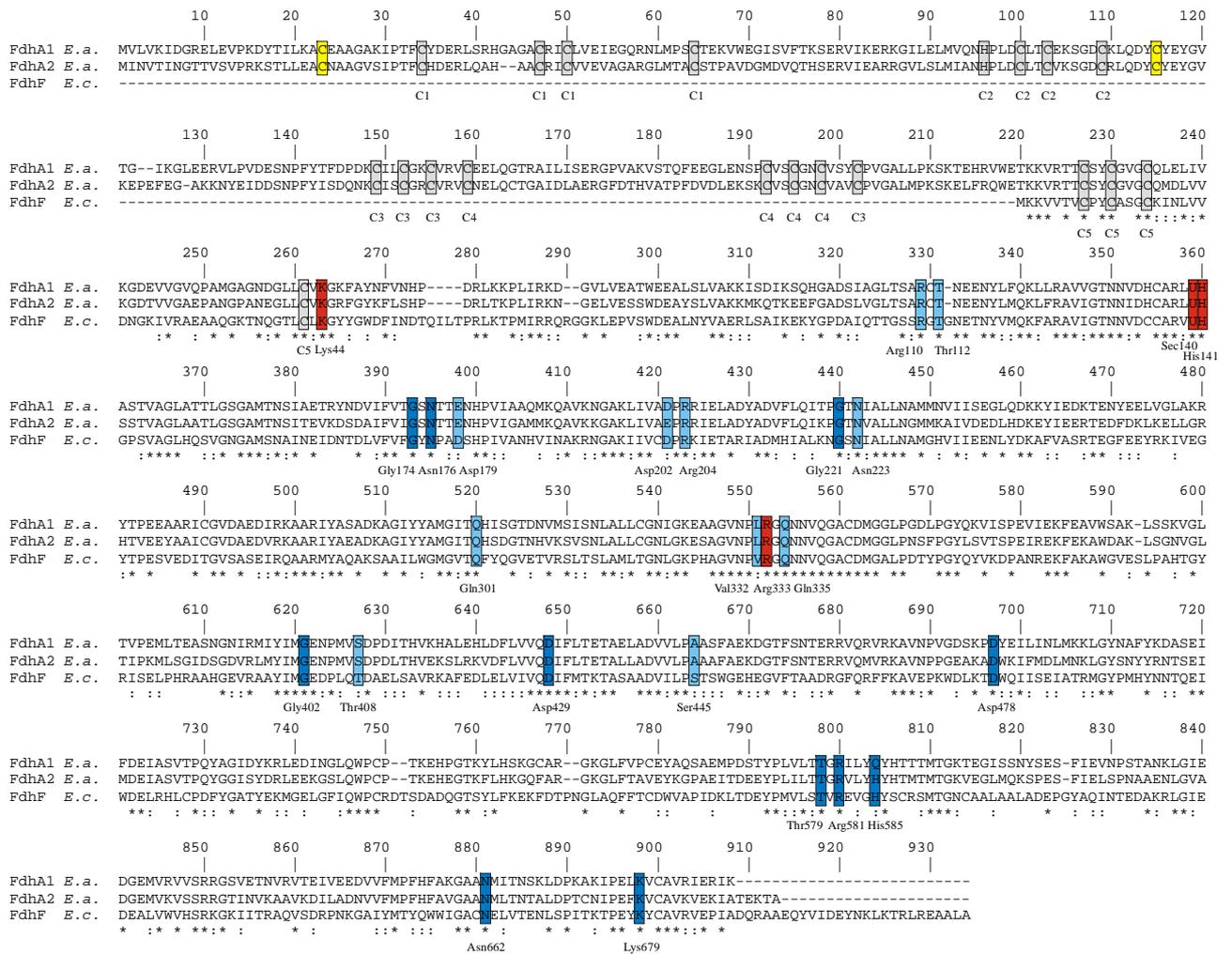


Abb. 4.2: Sequenzvergleich der katalytischen Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenasen von *E. acidaminophilum* (FdhA1, FdhA2) und Fdh-H von *E. coli* (FdhH). Durch farbige Kästen gekennzeichnet sind konservierte Cysteine, sowie Aminosäuren, die bei der Kristallstrukturanalyse von FDH-H von *E. coli* als an der Bindung der Cofaktoren und der Katalyse beteiligt identifiziert wurden. Grau: konservierte Cysteine, die am Aufbau der Eisen-Schwefel-Cluster C1 bis C5 beteiligt sind; gelb: in FdhA1 und FdhA2 konservierte Cysteine, die potentiell ein Disulfid ausbilden; rot: an der Katalyse bzw. am Elektronentransfer beteiligte Aminosäuren; blau: Aminosäuren, die über ihre Seitenketten die beiden Cofaktoren binden (dunkelblau: hoch konserviert; hellblau: konservativ ausgetauschbar). Im Alignment zwischen den drei Sequenzen sind mit * identische, mit : ähnliche Aminosäuren gekennzeichnet.

durch Bindung des Formiats ersetzt, wobei eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff des Formiats und der Seitenkette von Arg-333 ausgebildet wird. Die Bindung des negativ geladenen Substrates wird durch Wechselwirkungen mit der positiven Ladung des Arginins erleichtert. Die Oxidation des Formiats zu CO_2 erfolgt entweder durch einen Transfer von zwei Elektronen durch den Sauerstoff des Formiats auf das Molybdän oder durch einen direkten Hydrid-Transfer. Das α -Proton des Formiats wird auf His-141 übertragen, wobei intermediär das Selenocystein protoniert wird. Zur Reoxidation des Mo(IV) werden die beiden Elektronen nacheinander auf das [4Fe-4S]-Zentrum transferiert

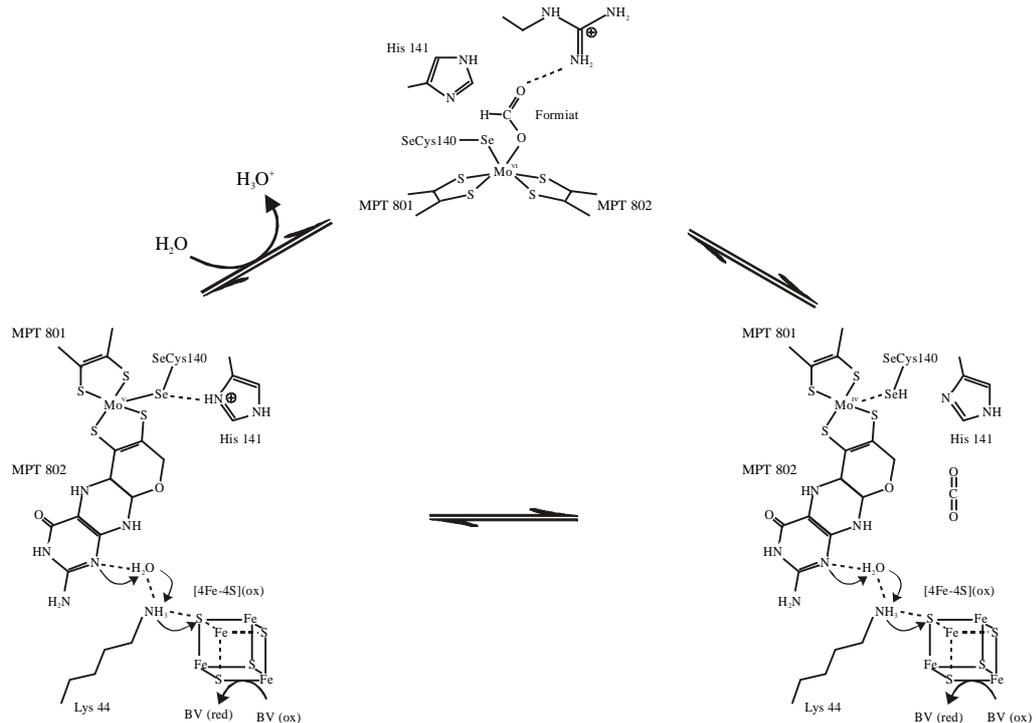


Abb. 4.3: Reaktionsmechanismus für FDH-H von *E. coli* nach BOYINGTON et al. (1997).

und von dort auf den immer noch unbekannt natürlichen bzw. einen artifiziellen Elektronenakzeptor übertragen. Die Elektronen werden wahrscheinlich vom Molybdän über das MPT 801, ein Wasser-Molekül und die ϵ -Aminogruppe des Lys-44 auf das S1 des [4Fe-4S]-Zentrums geleitet.

Diese drei für die Formiat-Oxidation essentiellen Aminosäuren (Lys-44, His-141, Arg-333 nach *E. coli*-Nomenklatur) sind in allen katalytischen Untereinheiten von Formiat-Dehydrogenasen konserviert, auch in FdhA1 und FdhA2 (Abb. 4.2, rot markierte Aminosäuren). Auch FdhA von *C. sticklandii* weist alle an Katalyse, Elektronentransport, Ausbildung des [4Fe-4S]-Zentrums und Bindung der beiden Cofaktoren beteiligten Aminosäuren auf (nicht gezeigt).

Aufgrund der Sequenz-Ähnlichkeit der FdhB-Proteine von *E. acidaminophilum* zu den entsprechenden N-terminalen Regionen von FdhA1/2 einschließlich der an dem Aufbau der Eisen-Schwefel-Zentren beteiligten Cysteine bzw. des Histidins kann postuliert werden, dass FdhB1 und FdhB2 über fünf Eisen-Schwefel-Zentren verfügen. Im einzelnen sind dies – wie bei FdhA1 und FdhA2 auch – ein [2Fe-2S]-Zentrum sowie vier [4Fe-4S]-Zentren.

Außer dem potentiellen Membranprotein HymD, über dessen Funktion spekuliert werden kann (s. 4.4), weisen alle anderen Untereinheiten der vom *hym*-Operon codierten Hydrogenase Eisen-Schwefel-Cluster auf. Die katalytische Untereinheit HymC besitzt hohe Sequenz-Ähnlichkeiten zu der Eisen-Hydrogenase

aus *C. pasteurianum* (s. oben). Die Cysteine und das Histidin, die am Aufbau der Eisen-Schwefel-Zentren beteiligt sind, sind auch in HymC konserviert, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass HymC ein [2Fe-2S]-Zentrum sowie drei [4Fe-4S]-Zentren enthält. Ein Cystein, das bei *C. pasteurianum* an der Bindung des [H]-Clusters beteiligt ist, ist in HymC nicht konserviert (3.1.5). Das [H]-Cluster der Hydrogenase von *C. pasteurianum* besteht aus einem [4Fe-4S]- und einem [2Fe]-Subcluster, die über ein Cysteinyl-Schwefel miteinander verbrückt sind. Das [2Fe]-Subcluster besteht aus zwei oktaedrisch ligandierten Eisen-Atomen, die über fünf CO/CN-, drei Schwefel- (davon ist ein Ligand der verbrückende Cysteinyl-Ligand) und einen Wasser-Liganden verfügen (PETERS et al. 1998). In HymC ist Cys-300, das an der Koordinierung des [4Fe-4S]-Subclusters geteilt ist, durch Serin ausgetauscht. Möglicherweise ist daher der Aufbau des [H]-Clusters von HymC aus *E. acidaminophilum* im Vergleich zu Hydrogenase-I von *C. pasteurianum* variiert.

Während der Anreicherung der FDH-II konnte beim Aktivitätstest in Mikrotiterplatten nur in den Fraktionen mit FDH-Aktivität auch „ohne“ Substrat eine langsame Entfärbung beobachtet werden. Dies ließe sich dadurch erklären, dass die mit der Formiat-Dehydrogenase assoziierte Hydrogenase den Wasserstoff in der Atmosphäre der Anaeroben-Box als Substrat genutzt haben könnte. Dies könnte als Hinweis gedeutet werden, dass HymC trotz der Variation des [H]-Clusters aktiv ist. Gleichzeitig zeigt dies aber auch, dass nicht nur HymA und HymB, sondern auch die katalytische Untereinheit der Hydrogenase HymC über mehrere chromatographische Schritte mit angereichert wurde. Bei einer erneuten Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase könnte parallel versucht werden, den Verbleib von HymC zu klären bzw. es zu reinigen.

Die mit FDH-II angereicherte elektronentransferierende Untereinheit der Hydrogenase HymB weist konservierte Cysteine auf, die potentiell ein [2Fe-2S]-Zentrum sowie drei [4Fe-4S]-Zentren bilden können (Abb. 4.1B). Das [2Fe-2S]-Zentrum befindet sich im N-terminalen Bereich, während die drei [4Fe-4S]-Zentren im C-terminalen Bereich lokalisiert sind. Im zentralen Sequenzbereich lassen sich zudem Bindemotive für NAD(P) und FMN postulieren. In der zu HymB hoch konservierten β -Untereinheit der Eisen-Hydrogenase von *T. maritima* sind die entsprechenden Cysteine ebenfalls konserviert, mittels EPR-Spektroskopie konnten jedoch nur ein [2Fe-2S]- und ein [4Fe-4S]-Zentrum identifiziert werden, obwohl der Eisengehalt der Untereinheit mit dem für drei [4Fe-4S]-Zentren übereinstimmt (VERHAGEN et al. 1999).

Für die kleinste Untereinheit der Hydrogenase, HymA, kann ein [2Fe-2S]-Zentrum postuliert werden, das in dem homologen Protein aus *D. fructosovorans* HndA nachgewiesen wurde (DE LUCA et al. 1998).

Geht man davon aus, dass FDH-II mit der Eisen-Hydrogenase (HymA-D) assoziiert vorliegt, und jedes beteiligte Protein nur einmal vorkäme, können für den Enzymkomplex minimal fünf [2Fe-2S]-Zentren und 14 [4Fe-4S]-Zentren, sowie ein [H]-Cluster und somit 72 Eisen-Atome postuliert werden.

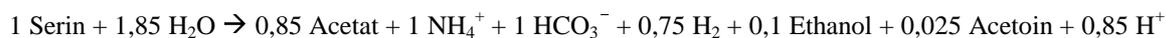
4.3 Funktion der Formiat-Dehydrogenasen im Stoffwechsel von *E. acidaminophilum*

Die Formiat-Dehydrogenase ist im Stoffwechsel von *E. acidaminophilum* an verschiedenen Stoffwechselwegen beteiligt und spielt daher eine sehr wichtige Rolle.

Eine vergleichsweise geringe Bedeutung weist sie beim Wachstum auf Glycin auf, wo im Zuge der Glycin-Oxidation intermediär Formiat entsteht, das durch die Formiat-Dehydrogenase dann zu CO₂ umgesetzt wird. Unter Berücksichtigung der bisherigen Kenntnisse des Stoffwechsels von *E. acidaminophilum* wäre Glycin das einzige Substrat, bei dem die Formiat-Dehydrogenase möglicherweise nicht essentiell ist. Die Disproportionierung des Glycins verschiebt sich zu einer reinen Glycin-Reduktion, wenn dem Medium Formiat im Überschuss zugesetzt wird (ZINDEL et al. 1988). Dies erscheint nachvollziehbar, da für die Oxidation des Formiats nur die Formiat-Dehydrogenase benötigt wird, Glycin aber unter Beteiligung von fünf Enzymkomplexen zu CO₂ oxidiert wird.

Wachstum mit Betain oder Sarkosin, die ausschließlich reduziert werden können, ist nur unter Zusatz eines oxidierbaren zweiten Substrates wie Formiat möglich. Als Elektronenlieferanten können neben Formiat aber auch Aminosäuren wie z. B. Alanin, Valin oder Aspartat dienen, die oxidativ abgebaut werden (ZINDEL et al. 1988).

Die Beteiligung der Formiat-Dehydrogenase beim Wachstum auf Serin als alleinige C- und Energiequelle ist auf den ersten Blick nicht ersichtlich und vor allem die Induktion der FDH-II durch Serin unverständlich. Serin wird durch die Serin-Dehydratase redoxneutral zu Pyruvat umgesetzt. Dieses sollte – nach bisheriger Vorstellung – durch eine Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR) zu Acetyl-CoA und CO₂ umgesetzt werden. Die entstehenden Reduktionsäquivalente würden durch Wasserstoffentwicklung verbraucht. Dieser Reaktionsweg wird scheinbar durch die Gärbilanz von *E. acidaminophilum* beim Wachstum auf Serin als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gestützt (ZINDEL et al. 1988):



Zwei verschiedene Ansätze könnten die Funktion der Formiat-Dehydrogenase beim Wachstum auf Serin erklären. Einerseits wäre denkbar, dass beim Abbau des Serins intermediär Formiat entstehen würde. In anaeroben Bakterien kann Pyruvat außer durch die PFOR auch durch die Aktivität einer Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) umgesetzt werden (SAWERS 1999). Ein Gen, das für die PFL codiert, konnte im Genom von *E. acidaminophilum* identifiziert werden (s. 3.5). Pyruvat wird durch die PFL redoxneutral zu Acetyl-CoA und Formiat gespalten. Das Formiat könnte, sofern der Wasserstoff-Partialdruck niedrig wäre, durch den Komplex aus FDH-II und Hydrogenase in der Summe ebenfalls redoxneutral zu CO₂ und H₂ umgesetzt werden. Der Vorteil der Umsetzung des Pyruvats durch die PFL und den Komplex aus FDH-II und Hym-Hydrogenase („Formiat-Hydrogen-Lyase“) ist eindeutig darin begründet, dass keine Reduktionsäquivalente freiwerden. Ist der Wasserstoff-Partialdruck zu hoch, wird Formiat nicht mehr umgesetzt und könnte ausgeschieden werden. Die Gärungsprodukte würden sich nicht unterscheiden,

egal, ob eine PFL oder eine PFOR an der Umsetzung des Pyruvats beteiligt wäre. Der Nachweis, dass das *pfl*-Gen exprimiert wird, insbesondere im Zusammenhang mit dem Wachstum auf Serin, steht allerdings noch aus.

Andererseits könnte die Formiat-Dehydrogenase beim Wachstum auf Serin auch als CO₂-Reduktase beteiligt sein. Bei höherem Wasserstoff-Partialdruck können Reduktionsäquivalente, die bei dem oxidativen Abbau des Pyruvats durch die PFOR entstehen, nicht mehr über die Freisetzung von Wasserstoff entsorgt werden. Als einziger weiterer Elektronenakzeptor steht CO₂ zur Verfügung. Dieses könnte durch die Aktivität der Formiat-Dehydrogenase zu Formiat reduziert werden. Bei der Anreicherung der Formiat-Dehydrogenase aus Serin-gewachsenen Zellen wurde während der Chromatographie an Q-Sepharose ein 130 kDa-Protein abgetrennt, das durch N-terminale Sequenzierung als PFOR identifiziert werden konnte (s. 3.4.12). In früheren Untersuchungen wurde festgestellt, dass die spezifische Aktivität der Pyruvat-Methylviologen-Oxidoreduktase im Rohextrakt von mit Serin gewachsenen Zellen nicht höher war als in dem Glycin-gewachsenen Zellen (0,095 U/mg gegenüber 0,13 U/mg), wohingegen andere am Serinstoffwechsel beteiligte Enzyme höhere spezifische Aktivitäten aufwiesen, wenn Serin als Substrat diente (ZINDEL et al. 1988). Der PFOR kommt beim Wachstum auf anderen Medien eine anabole Funktion zu. Pyruvat ist ein Schlüsselmetabolit für viele anabole Stoffwechselwege, z. B. Synthese von Aminosäuren und Gluconeogenese. Vermutlich besteht die Aufgabe der PFOR auch beim Wachstum von *E. acidaminophilum* auf Glycin darin, Pyruvat als Intermediat für die Synthese von Zellkohlenstoff zur Verfügung zu stellen. Daher wäre vorstellbar, dass die PFOR auf konstitutiv hohem Niveau exprimiert wird.

Die bisher vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass sowohl PFOR als auch PFL beim Wachstum von *E. acidaminophilum* auf Serin an der Umsetzung des Pyruvats beteiligt sind. Der Formiat-Dehydrogenase können daher zwei verschiedene Funktionen zugeordnet werden: die Oxidation des durch die Reaktion der PFL entstehenden Formiats, wobei die Reduktionsäquivalente auf die assoziierte Hydrogenase übertragen werden bzw. die Reduktion von CO₂, um Reduktionsäquivalente zu verbrauchen, die von der PFOR freigesetzt werden. Das gebildete Formiat kann durch Umkehrung der an der Oxidation von Glycin beteiligten Reaktionen weiter zu Glycin und über die Glycin-Reduktase zu Acetat umgesetzt werden (ANDREESEN 1994a). Alle beteiligten Reaktionen (mit Ausnahme der Glycin-Reduktion) sind reversibel. Dieser Weg wird vermutlich anabol zur Synthese von Glycin beim Wachstum auf Serin genutzt, da *E. acidaminophilum* nur über eine sehr geringe Serin-Hydroxymethyl-Transferase-Aktivität verfügt (ZINDEL et al. 1988). Die Bildung von ¹⁴C-markiertem Acetat aus ¹⁴CO₂ konnte durch SCHNEEBERGER et al. (1999) nachgewiesen werden. Intermediär wurde ¹⁴C-markiertes Formiat detektiert. Dazu wurden „resting cells“ in hohen Zelldichten (OD₆₀₀ = 15) verwendet, denen mit Alanin bzw. Valin nur oxidativ abzubauenen Aminosäuren sowie CO₂ als Elektronenakzeptor zur Verfügung gestellt wurden. Jedoch können die qualitativen Ergebnisse nicht schlüssig mit dem Stoffwechsel von *E. acidaminophilum* in Einklang gebracht werden. Die gemessenen Umsatzraten (4,5 mM gebildetes

Acetat innerhalb von 24 h, davon 2 mM aus Alanin) waren sehr niedrig, was darauf hindeutet, dass dieser Weg der CO₂-Fixierung in wachsenden Kulturen außer zu anabolen Zwecken keine Rolle spielt. In seiner natürlichen Umgebung wächst *E. acidaminophilum* mit großer Wahrscheinlichkeit bevorzugt syntroph, so dass dort keine Notwendigkeit besteht, das Formiat – außer für anabole Zwecke – weiter zu Acetat zu reduzieren. Es wurde nachgewiesen, dass *E. acidaminophilum* sowohl zu *interspecies hydrogen* als auch zu *interspecies formate transfer* in der Lage ist (ZINDEL et al. 1988). Beide Arten des Elektronentransports zwischen zwei verschiedenen Organismen spielen beim Abbau organischer Substrate eine große Rolle (SCHINK 1997). *E. acidaminophilum* akzeptiert als Substrat auch Aminosäuren, die nur oxidativ abgebaut werden können, sofern es in Cokultur mit einem Wasserstoff-verwertenden Organismus angezogen wird. Dabei ist vorstellbar, dass das ausgeschiedene Formiat sowohl im Zuge der Pyruvat-Umsetzung durch die PFL entsteht als auch durch Reduktion von CO₂.

Die Formiat-Dehydrogenase(n) ermöglichen *E. acidaminophilum* ein relativ grosses Substratspektrum, indem sie sowohl als Elektronendonatoren als auch als Elektronenakzeptoren dienen können. Beim Wachstum auf Serin kann *E. acidaminophilum* je nach den äußeren Bedingungen Reduktionsäquivalente in Form von H₂ abgeben oder Formiat als nicht vollständig oxidiertes Intermediat ausscheiden. In beiden Fällen kann dafür der Weg über PFOR oder über PFL genutzt werden.

4.4 Interaktion der Formiat-Dehydrogenase mit Elektronen-transferierenden Proteinen

Bisher war davon ausgegangen worden, dass NADP der natürliche Elektronenakzeptor der Formiat-Dehydrogenase ist (GRANDERATH 1993; ZINDEL et al. 1988), da im Rohextrakt mit NADP FDH-Aktivität nachgewiesen werden kann. Die NADP-abhängige FDH-Aktivität ging im Verlauf der Anreicherung verloren (GRANDERATH 1993). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die NADP-abhängige Aktivität der gereinigten Formiat-Dehydrogenase nicht gemessen. Weder FdhA1/2 noch FdhB1/2 weisen typische Nukleotid-Bindemotive auf. Im Falle der im Komplex mit HymB gereinigten FDH-II könnten die bei der Formiat-Oxidation freiwerdenden Elektronen über die zahlreichen Eisen-Schwefel-Cluster direkt auf die Hydrogenase übertragen werden. HymB weist ein typisches Nukleotid-Bindemotiv auf, wie auch die entsprechenden Untereinheiten der Eisen-Hydrogenasen aus *D. fructosovorans* und *T. maritima* (s. 3.1.5). Die im Rohextrakt gemessene NADP-abhängige Aktivität könnte daher über diese Untereinheit erklärt werden. HymB weist ebenfalls eine konservierte FMN-Bindedomäne auf, in dem UV/VIS-Spektrum wurde allerdings kein Hinweis auf ein Flavin erhalten.

Für die gereinigte Eisen-Hydrogenase aus *T. maritima*, zu der die Hym-Hydrogenase aus *E. acidaminophilum* hohe Homologien aufweist (s. 3.1.5), konnte allerdings bisher keine NAD(P)-abhängige Reaktion gemessen werden, obwohl diese im Rohextrakt bestimmt werden konnte (VERHAGEN et al. 1999). Ge-

bundenes Flavin wurde trotz der konservierten Bindedomäne für FMN in HydB (HymB-homologe Untereinheit) in dem gereinigten Protein aus *T. maritima* nicht gefunden. Auch nach Zusatz von FMN oder FAD konnte keine NADP-abhängige Aktivität festgestellt werden, auch reduziertes Ferredoxin war kein geeigneter Elektronendonator zur Messung der Wasserstoffentwicklung. Stattdessen konnte die H₂-abhängige Reduktion eines Chinons (Anthrachinon-2,6-Disulfonsäure; AQ) gemessen werden, wobei die β - und/oder γ -Untereinheiten (HymB bzw. HymA-Homolog) für die Interaktion mit AQ notwendig waren, da nur mit dem Holoenzym AQ-abhängige Aktivität nachweisbar war. Im Gegensatz dazu konnte mit der isolierten α -Untereinheit (HymC-Homolog) Methylviologen-abhängige Aktivität vergleichbar der des Holoenzym gefunden werden. Auch wurde im Rohextrakt von *T. maritima* eine beträchtliche NADH-AQ-Oxidoreduktase-Aktivität gefunden. Die AQ-abhängige Aktivität der Hydrogenase aus *T. maritima* kann man bisher nicht erklären, da keine Hinweise auf eine Lokalisierung an der Cytoplasma-Membran vorliegen. Weder die Hydrogenase noch die Formiat-Dehydrogenasen von *E. acidaminophilum* wurden bisher darauf getestet, ob sie eine Chinon-abhängige Aktivität besitzen. Dies könnte einen Hinweis darauf liefern, dass diese Proteine möglicherweise mit einer Membranenergetisierung in Zusammenhang stehen.

Die FDH-II ist mit großer Wahrscheinlichkeit Membran-assoziiert, da die Hym-Hydrogenase, mit der sie assoziiert vorliegt, über ein bisher einzigartiges Protein verfügt (HymD), das potentiell sechs Membrandurchgänge aufweist. Möglicherweise ist auch FDH-I an der Cytoplasma-Membran lokalisiert, wie für Proteine wie Thioredoxin-Reduktase und Protein A durch immunocytochemische Methoden nachgewiesen wurde (FREUDENBERG et al. 1989). Diese Proteine stellen die Empfänger der bei der Formiat-Oxidation freiwerdenden Elektronen dar (s. u.).

Beim Wachstum von *E. acidaminophilum* auf Glycin oder Formiat/Betain werden die bei der Formiat-Oxidation freiwerdenden Elektronen zur Reduktion von Glycin bzw. Betain genutzt. Beiden Reduktase-Systemen dient das NADPH-abhängige Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase-System als Elektronendonator (MEYER 1993; DIETRICH et al. 1991). Da die Formiat-Dehydrogenase nicht direkt mit NADP reagieren kann, ist anzunehmen, dass mindestens ein weiteres Elektronen-transferierendes Enzym wie NADP-Ferredoxin-Oxidoreduktase oder Ferredoxin-Thioredoxin-Oxidoreduktase zwischen Formiat-Dehydrogenase und Thioredoxin-Reduktase vermittelt. Eine NADP-Ferredoxin-Oxidoreduktase wurde in Zellextrakten von *Clostridium kluyveri* und *C. pasteurianum* nachgewiesen (THAUER et al 1970; JUNGERMANN et al. 1973), nicht jedoch in dem von *E. acidaminophilum* (CLAAS 1991). Eine Ferredoxin-Thioredoxin-Oxidoreduktase wurde aus *C. pasteurianum* gereinigt (HAMMEL et al. 1983). Der PCR-gestützte Nachweis einer Ferredoxin-Thioredoxin-Oxidoreduktase im Genom von *E. acidaminophilum* unter Einsatz degenerierter aus konservierten Regionen pflanzlicher bzw. hypothetischer prokaryontischer Ferredoxin-Thioredoxin-Oxidoreduktasen abgeleiteter Primer schlug fehl (KEIL 1999).

Im Prinzip besteht die Aufgabe einer Ferredoxin-Thioredoxin-Oxidoreduktase darin, zwischen Ein-Elektronenübertragungen durch Eisen-Schwefel-Zentren und Zwei-Elektronenübertragungen mittels Dithiol-Gruppe zu vermitteln. In diesem speziellen Fall würde die Dithiol-Gruppe von der Thioredoxin-Reduktase oder direkt vom Thioredoxin zu einer Disulfid-Brücke oxidiert werden und durch zwei Elektronen, die über [4Fe-4S]-Zentren angeliefert werden, wieder reduziert. Im N-terminalen Bereich von FdhA1 und FdhA2 befinden sich neben den an der Ausbildung der Eisen-Schwefel-Zentren beteiligten Cysteinen zwei weitere bei keiner anderen katalytischen Untereinheit von Formiat-Dehydrogenase konservierte Cysteine (FdhA1: Cys-23 und Cys-115; in Abb. 4.2 gelb gekennzeichnet). Auch in FdhB1 und FdhB2, die den N-terminalen Bereichen der FdhA-Proteine sehr ähnlich sind, sind diese Cysteine nicht konserviert. Es wäre durchaus möglich, dass die Formiat-Dehydrogenase selbst eine interne Ferredoxin-Thioredoxin-Oxidoreduktase-Aktivität aufweist, indem die postulierte Dithiolgruppe von Thioredoxin oder Thioredoxin-Reduktase oxidiert und nachfolgend durch Elektronen, die bei der Formiat-Oxidation freiwerden, wieder reduziert wird.

Für die teilgereinigte Formiat-Dehydrogenase aus *E. acidaminophilum*, die keine NADP-abhängige Aktivität mehr aufwies, konnte diese Aktivität durch Zusatz von Thioredoxin-Reduktase rekonstituiert werden (GRANDERATH 1993). Die spezifische Aktivität konnte durch Zusatz von Thioredoxin bzw. Thioredoxin und Protein A noch erhöht werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass möglicherweise tatsächlich kein weiteres Protein notwendig ist, um eine Elektronenübertragung von der Formiat-Dehydrogenase auf Thioredoxin oder Thioredoxin-Reduktase zu ermöglichen. Da die spezifische Aktivität bei Zusatz von Thioredoxin erhöht war, wäre es auch möglich, dass Thioredoxin der direkte Elektronenakzeptor ist. Die insgesamt relativ niedrige spezifische Aktivität kann darauf zurückgeführt werden, dass die Thioredoxin-Reduktase in dem verwendeten Testansatz mit der Reduktion von NADP die ihrer sonstigen physiologischen Funktion entgegengesetzte Richtung katalysieren muss. Bei der Reinigung der FDH-I aus Zellen, die mit Formiat und Betain gewachsen waren, war eine starke Assoziation der Formiat-Dehydrogenase mit Proteinen der Betain-Reduktase beobachtet worden (MEYER et al. 1995; GRANDERATH 1993). Es kann daher angenommen werden, dass Formiat-Dehydrogenase und Betain-Reduktase auch in der Zelle gekoppelt vorliegen. Daher wäre es nur sinnvoll, wenn Reduktionsäquivalente z. B. in Form von NADPH gar nicht erst freigesetzt, sondern die Elektronen mit Thioredoxin als Vermittler direkt von der Formiat-Dehydrogenase auf Protein A der Betain-Reduktase übertragen würden. Der Umweg über eine NADP-Ferredoxin-Oxidoreduktase oder Ferredoxin-Thioredoxin-Oxidoreduktase wäre in diesem Szenario überflüssig.

Allerdings wurde die NADP-abhängige FDH-Aktivität im Rohextrakt nicht beeinflusst, wenn die Thioredoxin-Reduktase mit Hilfe von Thioredoxin-Reduktase-spezifischen Antikörpern abgetrennt wurde (GRANDERATH 1993). Möglicherweise sind noch andere Proteine in der Lage, Elektronen von der Formiat-Dehydrogenase auf NADP zu übertragen.

Beim Wachstum auf Serin sind für die Formiat-Dehydrogenase verschiedene Funktionen denkbar, je nachdem ob das aus Serin entstehende Pyruvat durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase oder die Pyruvat-Formiat-Lyase umgesetzt wird (s. 4.3). Demzufolge ergeben sich auch unterschiedliche Interaktionen mit elektronentransferierenden Proteinen. Wird Pyruvat durch die PFOR oxidativ decarboxyliert, besteht bei hohem Wasserstoff-Partialdruck die Aufgabe der Formiat-Dehydrogenase in dem Verbrauch der Reduktionsäquivalente durch Reduktion von CO_2 zu Formiat. In diesem Falle müssten Elektronen von der PFOR auf die Formiat-Dehydrogenase übertragen werden. Im Gegensatz dazu wird Pyruvat von der Pyruvat-Formiat-Lyase redoxneutral zu Acetyl-CoA und Formiat gespalten. Das Formiat könnte, je nach Höhe des Wasserstoff-Partialdrucks, durch den Komplex aus FDH-II und Hydrogenase in der Summe ebenfalls redoxneutral umgesetzt oder ausgeschieden werden.

PFORs enthalten den Cofaktor Thiamin-Pyrophosphat (TPP), [4Fe-4S]-Zentren und kommen in homodimerer (A_2), heterodimerer ($[ab]_2$) oder heterotetramerer ($\alpha\beta\gamma\delta$) Form vor. Diese drei Arten sind phylogenetisch verwandt, ihr Entstehen wird durch Rearrangement und Fusion von vier Vorläufer-Genen erklärt (CHARON et al. 1999). Die Aufklärung der Kristallstruktur der homodimeren PFOR aus *Desulfovibrio africanus* ergab, dass sich das Protein in sieben Domänen gliedert. Pro Untereinheit enthält es ein Molekül TPP sowie drei [4Fe-4S]-Zentren. Ein „atypisches“ [4Fe-4S]-Zentrum befindet sich nahe der Pyrophosphatgruppe des TPP, die beiden anderen werden von der Ferredoxin-ähnlichen Domäne V gebunden (CHABRIÈRE et al. 1999). Domäne IV und V entsprechen der δ -Untereinheit der heterotetrameren PFOR und fehlen in der heterodimeren Form. Die rekombinant hergestellte δ -Untereinheit der PFOR vom $\alpha\beta\gamma\delta$ -Typ aus *P. furiosus* konnte *in vitro* Ferredoxin als Elektronen-Überträger zwischen PFOR und Ferredoxin-NADP-Reduktase ersetzen (MENON et al. 1998). Dies deutet einerseits darauf hin, dass die δ -Untereinheit aus einem [8Fe]-Ferredoxin entstanden sein könnte (MENON et al. 1998), andererseits zeigt es, dass die PFOR nicht unbedingt mit einem Ferredoxin reagieren muss, sondern auch eine Ferredoxin-ähnliche Domäne akzeptiert. Sowohl FdhA1/2 als auch FdhB1/2 enthalten zwei typische [4Fe-4S]-Zentren vom Ferredoxin-Typ, deren Sequenzmotive CxxCxxCxxxC allerdings einen etwas größeren Abstand zueinander aufweisen als die im Ferredoxin von *E. acidaminophilum* (32 gegenüber 19 Aminosäuren). Auch HymB enthält im C-terminalen Teil zwei [4Fe-4S]-Zentren vom Ferredoxin-Typ, die einen Abstand von 19 Aminosäuren aufweisen. Daher wäre es durchaus möglich, dass die PFOR die Elektronen von ihrer eigenen Ferredoxin-ähnlichen Domäne direkt auf die Ferredoxin-ähnliche Domäne von Formiat-Dehydrogenase oder Hydrogenase überträgt. Da zumindest FDH-II und die Hym-Hydrogenase assoziiert vorliegen, wäre auch vorstellbar, dass die Elektronen auf die Ferredoxin-ähnliche Domäne von HymB übertragen werden, und von dort auf die katalytischen Untereinheiten von Formiat-Dehydrogenase oder Hydrogenase verteilt würden, je nachdem, ob der Wasserstoff-Partialdruck hoch oder niedrig ist, und somit H_2 oder Formiat gebildet werden kann (s. 4.3). HymB käme in diesem Fall eine entscheidende Rolle zu. Bei niedrigem Wasserstoff-Partialdruck liefe wahrscheinlich die Wasserstoff-Entwicklung bevorzugt ab, während bei höherem Wasserstoff-Partialdruck durch die Formiat-

Dehydrogenase CO_2 reduziert würde, um die anfallenden Reduktionsäquivalente zu verbrauchen. Die Redoxpotentiale E'_0 für H^+/H_2 und $\text{CO}_2/\text{Formiat}$ sind vergleichbar (-0,43 V/-0,41 V), so dass vom thermodynamischen Standpunkt her beide Reaktionen gleichwertig sind. Möglicherweise könnten im nativen Zustand auch Elektronen über NADPH oder reduziertes FMN über HymB in den Formiat-Dehydrogenase/Hydrogenase-Komplex eingeschleust werden.

Die PFOR aus *E. acidaminophilum* konnte aufgrund ihrer Sauerstoff-Empfindlichkeit bisher nicht angereichert werden (CLAAS 1991). Im Laufe dieser Arbeit wurde der N-Terminus eines 130 kDa-Proteins bestimmt, der 80 % Identität mit dem N-Terminus der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *C. pasteurianum* (Acc. Nr. Y17726; Abb. 3.15) aufweist. Daher kann angenommen werden, dass es sich bei diesem Protein um eine PFOR handelt, zumal auch die Größe denen der homodimeren PFORs wie sie auch *C. pasteurianum* besitzt, entspricht (CHARON et al. 1999). Ausgehend von dem nun bekannten N-Terminus ließe sich das entsprechende Gen aus dem Genom von *E. acidaminophilum* klonieren. Wäre die Proteinsequenz bekannt, könnte auch festgestellt werden, ob die PFOR aus *E. acidaminophilum* wie die aus *D. africanus* eine C-terminale Disulfidbrücke besitzt, die das Enzym vor Sauerstoff schützt. Wurde diese Sequenz deletiert oder die Disulfidbrücke durch Zugabe von SH-Reagenzien reduziert, erhöhte sich die Sauerstoff-Labilität des Enzyms (PIEULLE et al. 1997). Sollte sich diese Disulfidbrücke in der PFOR von *E. acidaminophilum* finden, sollten bei einer erneuten Aufreinigung keine SH-Reagenzien zugesetzt werden.

Gereinigtes Ferredoxin aus *E. acidaminophilum* konnte durch die teilgereinigte PFOR reduziert werden, wenn Pyruvat als Substrat zur Verfügung stand (CLAAS 1991). Beim Vergleich der für das gereinigte Ferredoxin erhaltenen Daten (CLAAS 1991) mit denen des aus *E. acidaminophilum* klonierten Ferredoxins (s. Anhang I) deutet sich an, dass der Organismus zwei verschiedene Ferredoxine vom Clostridien-Typ besitzt. So wurde für das gereinigte Ferredoxin im Bradford-Test keine Absorption bei 590 nm erhalten (CLAAS 1991), was darauf hindeutet, dass das Protein kein Lysin und Arginin enthält. Das klonierte Ferredoxin jedoch enthält zwei Lysine, sowie zwei Arginine. Die Größe der beiden Proteine stimmt mit je 6,1 kDa überein. Eine heterologe Hybridisierung mit einer aus dem Ferredoxin-Gen aus *C. pasteurianum* abgeleiteten Sonde (die Sonde ging allerdings über das Gen hinaus) zeigte im Southern Blot jeweils zwei Banden pro Enzym (KEIL 1999), obwohl in der bekannten Ferredoxin-Gensequenz aus *E. acidaminophilum* keine Schnittstellen vorkommen. Auch dieses Ergebnis deutet auf zwei Ferredoxin-Gene im Genom von *E. acidaminophilum* hin.

Pyruvat-Formiat-Lyasen (Übersichtsartikel: SAWERS 1999) erreichen eine redoxneutrale Umsetzung ihres Substrates, indem die C-C-Bindung durch einen radikalischen Mechanismus homolytisch gespalten wird. Die PFL ist ein Homodimer von 80 – 85 kDa, wobei eine Untereinheit ein Glycyl-Radikal enthält. Dieses wird durch ein 28 kDa-großes, Eisen-abhängiges PFL-aktivierendes Enzym (Act) gebildet. Das Glycyl-Radikal stellt die stabile Speicherform des Enzyms dar, während der Reaktion wird der radikali-

sche Charakter auf zwei benachbarte Cysteine im aktiven Zentrum übertragen. Pyruvat-Formiat-Lyasen wurden bisher in verschiedenen anaeroben Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien nachgewiesen sowie die Gensequenz bestimmt, so z. B. aus *E. coli* (KNAPPE UND SAWERS 1990) und *C. pasteurianum* (WEIDNER UND SAWERS 1996). Der Pyruvat-Formiat-Lyase wurde in Gram-positiven und speziell in Clostridien bisher eine eher anabole Funktion im C1-Stoffwechsel zugeordnet, da sie überwiegend in Arten vorkommt, die keine Formiat-Dehydrogenase mit CO₂-Reduktase-Aktivität besitzen (SAWERS 1999; THAUER et al. 1972).

In *E. acidaminophilum* könnte durch die Aktivität einer PFL Pyruvat redoxneutral zu Acetyl-CoA und Formiat gespalten werden. Das Formiat würde dann von der Formiat-Dehydrogenase zu CO₂ oxidiert werden, die freiwerdenden Elektronen auf die assoziierte Hydrogenase übertragen und von dieser Wasserstoff freigesetzt. Der reibungslose Elektronenfluss zwischen den beiden katalytischen Zentren wäre durch die hohe Anzahl von Eisen-Schwefel-Zentren in beiden Enzymen gewährleistet (s. 4.2). Möglicherweise kann im Zuge der Umsetzung des Formiats zu CO₂ und H₂ Energie konserviert werden, die berechnete freie Energie $\Delta G'_0 = -162,09$ kJ würde theoretisch die Bildung von ATP zulassen. Die Synthese eines ATP benötigt eine freie Energie von mindestens -70 kJ (THAUER et al. 1977). Die mit FDH-II assoziierte und vom *hym*-Operon codierte Hydrogenase verfügt über eine Untereinheit (HymD), für die sechs Membrandurchgänge postuliert wurden (Abb. 3.4), wie dies bei vielen Transportproteinen z. B. auch FdhC (s. 3.1.2) der Fall ist. HymD weist keine signifikanten Homologien zu bekannten oder hypothetischen Proteinen aus Datenbanken auf. Um als Membrananker zu fungieren, wäre nur ein Membrandurchgang notwendig, wie dies in den β -Untereinheiten der FDH-N und FDH-O von *E. coli* der Fall ist (BENOIT et al. 1998). HymD könnte für eine Verbindung des Komplexes aus FDH-II und Hydrogenase zur Membran zuständig sein, und möglicherweise gekoppelt an die Wasserstoff-Entwicklung durch die Hydrogenase Protonen oder Na⁺-Ionen über die Membran transportieren und so zu ihrer Energetisierung beitragen. Das Plasmid pFDH1/3, dessen Insert das HymD codierende Gen enthielt, war toxisch für *E. coli* (s. 3.1.1). Die Toxizität lässt sich durch die anderen von dem entsprechenden *EcoRI*-Fragment codierten Gene (*fdhA1*, *fdhB1*, *mog*, *mobA*, *fdhD*) nicht schlüssig erklären. Wenn HymD ein Membranprotein wäre, dass an H⁺- oder Na⁺-Transportprozessen über die Cytoplasmamembran beteiligt wäre, könnte dieses Protein, würde es ohne die übrigen Untereinheiten der Hydrogenase exprimiert, durchaus schon in geringen Mengen toxisch für *E. coli* sein.

E. acidaminophilum wächst im Gegensatz zu *C. litorale* (FENDRICH et al. 1990) nur äußerst schlecht mit Wasserstoff als Elektronendonator (z. B. in Kombination mit Betain). Könnte *E. acidaminophilum* im Zuge der Wasserstoff-Entwicklung Energie konservieren, wäre dieses Verhalten dadurch erklärbar, dass umgekehrt die Nutzung von Wasserstoff als Elektronenquelle dann Energie-aufwendig wäre.

Könnte *E. acidaminophilum* durch die mit der Formiat-Oxidation gekoppelten Wasserstoff-Freisetzung Energie konservieren, müsste der Zellertrag des Organismus durch Zugabe von Formiat verbessert werden, sofern der Wasserstoff-Partialdruck niedrig gehalten wird. Die bisher erfolgte Anzucht des Bakteriums in Serin- und Serin/Formiat-Medium kann nicht als Beispiel dienen, da der entstehende Wasserstoff

Zur weiteren Charakterisierung des Serin-Stoffwechsels von *E. acidaminophilum* sollte die PFOR kloniert und sequenziert werden, um mit Hilfe von Northern Hybridisierung und semi-quantitativer RT-PCR Aussagen über den Anteil von PFL und PFOR am Umsatz des Pyruvats zu erhalten. Doch unabhängig davon, welches Enzym den größeren Anteil daran besitzt, die Assoziation von Formiat-Dehydrogenase und Hydrogenase macht in beiden Fällen Sinn. Im Falle einer vorherrschenden Pyruvat-Formiat-Lyase würden beim Abbau des entstandenen Formiats zu CO₂ und H₂ keine Reduktionsäquivalente freigesetzt werden. Erfolgt die Umsetzung des Pyruvats durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase, könnte HymB die Elektronen je nach Höhe des Wasserstoff-Partialdrucks auf Hydrogenase oder Formiat-Dehydrogenase weiterleiten.

4.5 Bedeutung von Wolframat und Molybdat

In allen bisher bekannten Molybdo- und Wolframenzymen – mit Ausnahme der Nitrogenase – wird das Metall durch Dithiolengruppen von einem oder zwei Pterin-Cofaktoren komplexiert. Dieser Cofaktor wird, auch wenn er Wolfram komplexiert, Molybdopterin genannt, bzw. seltener Tungstopterin. Die Mononukleotidform des Cofaktors (MPT) besteht aus einem tricyclischen Pyranopterin, das eine Dithiolengruppe sowie ein Phosphat enthält (Abb. 4.5; JOHNSON UND RAJAGOPALAN 1982; CHAN et al. 1995). In der Dinukleotidform des Cofaktors wird ein Nukleotid (AMP, GMP, CMP oder IMP) über eine Pyrophosphatbindung an MPT gebunden.

In Reviews werden Molybdo- und Tungstoenzyme meist getrennt voneinander behandelt, und dementsprechend auch in getrennte Familien unterteilt (ROMÃO et al. 1997; KLETZIN 1997; KLETZIN UND ADAMS 1996; HILLE 1996; JOHNSON et al. 1996). Die Molybdoenzyme werden in drei Familien unterteilt: die Xanthin-Oxidase-, DMSO-Reduktase- und Sulfit-Reduktase-Familie. Die Wolfram-haltigen Enzyme werden meist ebenfalls in drei Familien eingeteilt: die AOR-, Formiat-Dehydrogenase/Formylmethanofuran-Dehydrogenase- und die Acetylen-Hydratase-Familie. In den letzten Jahren sind sehr viele Wolfram- und Molybdän-haltige Enzyme gereinigt und charakterisiert, kloniert und sequenziert worden, von einigen Vertretern wurde auch die Tertiärstruktur durch röntgenkristallographische Untersuchungen bestimmt. Werden all die neuen Erkenntnisse berücksichtigt, kann die strenge Unterscheidung zwischen Wolfram- und Molybdoenzymen nicht mehr aufrechterhalten werden.

Viele Wolfram-Enzyme kommen auch in einer Molybdän-haltigen Isoform vor, und strukturell gesehen, weist z. B. die Formiat-Dehydrogenase/Formylmethanofuran-Dehydrogenase-Familie der Wolfram-Enzyme sehr große Gemeinsamkeiten zu der DMSO-Reduktase-Familie der Molybdoenzyme auf, die die Molybdän-haltigen Formiat-Dehydrogenasen beinhaltet. Sinnvoll ist daher die Zusammenfassung der

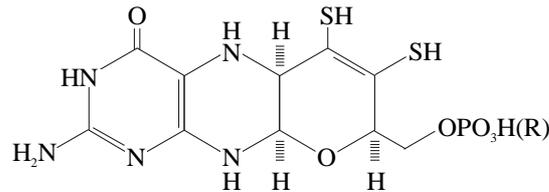


Abb. 4.5: Strukturmodell des Molybdopterins. An die Phosphatgruppe kann ein Nukleotid (R) gebunden werden.

Wolfram- und Molybdän-haltigen Enzyme (mit Ausnahme der Nitrogenase) zu einer Klasse von Molybdopterin-haltigen Enzymen wie dies auch von KISKER et al. (1999) vorgenommen wurde.

Diese können in fünf Familien aufgeteilt werden, wobei sich meist in einer Familie sowohl Wolfram- als auch Molybdän-haltige Enzyme befinden (KLETZIN 1997; KLETZIN UND ADAMS 1996; JOHNSON et al. 1996; sofern nicht gesondert zitiert):

1. Xanthin-Oxidase-Familie: Zu dieser großen Gruppe gehören z. B. die Xanthin-Oxidasen und Xanthin-Dehydrogenasen, Aldehyd-Oxidase, Molybdän-abhängige CO-Dehydrogenase und Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas*, *D. desulfuricans* (REBELO et al. 2000) und *D. alaskensis* (ANDRADE et al. 2000). Auch die Mo-AOR aus *C. formicoaceticum* gliedert sich in diese Familie ein, ebenso eine Mo-abhängige trimere AOR aus *Sulfolobus acidocaldarius* (KARDINAHN et al. 1999). Diese Enzyme besitzen einen Mo^{VI}OS-Kern, der von nur einem Molybdopterin-Cofaktor und keinem Proteinliganden komplexiert wird. Im Falle der Aldehyd-Oxidoreduktasen weist das Protein zwei [2Fe-2S]-Zentren und einen MCP- bzw. MGD-Cofaktor pro Untereinheit auf. In diese Familie wurden bisher ausschließlich Molybdän-haltige Enzyme eingeordnet. Sowohl *C. formicoaceticum* als auch *D. gigas* besitzen je eine zur Xanthin-Oxidase-Familie gehörende Molybdän-abhängige Aldehyd-Oxidoreduktase, sowie eine zweite sich in die AOR-Familie einfügende Wolfram-abhängige AOR.
2. DMSO-Reduktase-Familie: Neben der DMSO-Reduktase (Dimethylsulfoxid-Reduktase) beinhaltet diese sehr umfangreiche Familie die Formiat-Dehydrogenasen und die mit ihnen verwandten Formylmethanofuran-Dehydrogenasen, dissimilatorische Nitrat-Reduktasen, Trimethylamin-N-oxid-Reduktase (TMAOR) und Biotin-S-Oxid-Reduktase. Das Metall wird bei den Mitgliedern dieser Familie durch zwei MGD-Cofaktoren sowie eine Aminosäure-Seitenkette koordiniert. Dies ist z. B. Selenocystein und Cystein im Falle der Formiat-Dehydrogenasen, Cystein bei der periplasmatischen Nitrat-Reduktase oder Serin bei der DMSO-Reduktase. Sowohl bei den Formiat-Dehydrogenasen als auch bei den Formylmethanofuran-Dehydrogenasen wurden Wolfram- und Molybdän-haltige Vertreter identifiziert. Auch die Pyrogallol-Phloroglucinol Transhydroxylase aus *Pelobacter acidigallici* wurde aufgrund von Sequenzhomologien in diese Familie eingeordnet (KISKER et al. 1999), ebenso

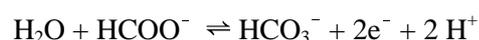
- die Selenat-Reduktase aus *Thauera selenatis* (KRAFFT et al. 2000). Es darf weiterhin vermutet werden, dass auch die (Per)Chlorat-Reduktase aus Stamm GR-1 sich in diese Familie eingliedern wird (KENGEN et al. 1999).
3. Zu der Sulfit-Reduktase-Familie gehört neben der Sulfit-Reduktase auch die assimilatorische Nitrat-Reduktase. Die Mitglieder dieser Familie besitzen einen $\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_2$ -Kern, der von einem Molybdopterin-Cofaktor sowie einer Cystein-Seitenkette komplexiert wird. Für diese Familie ist bisher kein Wolfram-abhängiger Vertreter bekannt. Mit der Sulfit-Reduktase aus Huhn wurde auch für einen Vertreter dieser Familie die Struktur aufgeklärt (KISKER et al. 1997).
 4. AOR-Familie: Diese Familie enthält überwiegend Wolfram-haltige Enzyme wie AOR, FOR und GAPOR aus *P. furiosus*, CAR aus *M. thermoacetica* und *C. formicoaceticum*, die W-abhängige ADH aus *D. gigas* sowie W-XOR aus *Methanococcus jannaschii*. In diese Familie gliedert sich auch die Molybdän-haltige Hydroxycarboxylat-Viologen-Oxidoreduktase (HVOR) aus *Proteus vulgaris* ein. Die Enzyme dieser Familie besitzen einen $\text{W}^{\text{VI}}\text{O}_2$ -Kern, der von den Dithiolen-Schwefel-Atomen zweier Molybdopterin-Cofaktoren koordiniert wird. Die beiden Cofaktoren liegen in der Mononukleotidform vor und werden durch ein Magnesium-Ion verbrückt. Es bestehen keine Sequenzähnlichkeiten zwischen den Aldehyd-Oxidoreduktasen der AOR- und der Xanthin-Oxidase-Familie. Die wolfram-abhängige AOR aus *E. acidaminophilum*, die hohe Sequenz-Homologien zu der AOR aus *P. furiosus* aufweist, kann der AOR-Familie zugeordnet werden (RAUH 2000). Auch die AOR/CAR aus *C. sticklandii* lässt sich aufgrund von Sequenzhomologien (s. 3.2.1) dieser Familie zuordnen.
 5. Acetylen-Hydratase-Familie: Diese Familie weist bisher nur den namensgebenden Vertreter auf, die Wolfram-haltige Acetylen-Hydratase aus *Pelobacter acetylenicus*. Dieses Enzym katalysiert die Hydratisierung von Acetylen zu Acetaldehyd und weicht daher von allen anderen Wolfram- und Molybdän-haltigen Enzymen dadurch ab, dass es keine Redoxreaktion katalysiert. Acetylen-Hydratase enthält zwei Moleküle MGD pro Untereinheit und ein [4Fe-4S]-Zentrum (MECKENSTOCK et al. 1999). Auch ein Molybdän-haltiges Isoenzym konnte isoliert werden, wenn der Organismus in Abwesenheit von Wolfram angezogen wurde (KISKER et al. 1999). Bisher ist die Sequenz des Proteins noch nicht bekannt, möglicherweise würde es sich anhand von Sequenzähnlichkeiten in die DMSO-Reduktase-Familie eingliedern lassen, zu deren Mitgliedern es vom Aufbau her Gemeinsamkeiten besitzt.

Studien mit chemisch synthetisierten Analoga der aktiven Zentren Mo- und W-enthaltender Enzyme haben fundamentale Unterschiede in der Chemie der vergleichbaren Mo- und W- Komplexe aufgezeigt (JOHNSON et al. 1996). W(VI)-Komplexe sind äußerst Sauerstoff-empfindlich, thermisch wesentlich stabiler und besitzen ein um 300-400 mV niedrigeres Redoxpotential verglichen mit ihrem Mo(VI)-Gegenstück. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde postuliert, dass Wolfram von biologischen Systemen nur zur Katalyse von Reaktionen mit niedrigen Redoxpotentialen bei hohen Temperaturen unter

anaeroben Bedingungen genutzt werde und signifikante Katalyseraten in Sauerstoff-Transfer-Reaktionen nur bei hohen Temperaturen zu erreichen seien. Andererseits sollten diese Reaktionen bei Temperaturen um 100 °C nicht von Mo-Isoenzymen ausgeführt werden können (durchaus aber bei niedrigeren Temperaturen), sowie Reaktionen mit relativ hohem Redoxpotential wie die Nitrat-Reduktion nicht von W-haltigen Enzymen katalysiert werden (JOHNSON et al. 1996).

Viele dieser Vorhersagen treffen zu. So sind die meisten W-abhängigen Enzyme aus thermophilen und hyperthermophilen anaeroben Organismen isoliert worden. Bei ihnen handelt es sich (mit Ausnahme der Acetylen-Dehydratase) um Enzyme, die Reaktionen mit sehr niedrigem Redoxpotential katalysieren können, wie die Reduktion von Acetat zu Acetaldehyd durch die AOR oder die Reduktion von CO₂ zu Formiat bzw. Formylmethanofuran durch die Formiat-Dehydrogenase bzw. Formylmethanofuran-Dehydrogenase. Jedoch können diese Enzyme auch die entsprechenden Oxidationsreaktionen katalysieren, und im Aktivitätstest *in vitro* laufen diese Reaktionen meist schneller ab. Formylmethanofuran-Dehydrogenasen katalysieren *in vivo* die Reduktion von CO₂ und auch Organismen, die über eine W-abhängige Formiat-Dehydrogenase verfügen, müssen zumindest unter gewissen Stoffwechsel-Bedingungen die Reduktion von CO₂ katalysieren können. Über die bevorzugte Katalyserichtung der AOR *in vivo* ist nichts bekannt.

Auch die Formiat-Dehydrogenase von *E. acidaminophilum* passt in dieses Schema. Beim Wachstum auf Serin kann Glycin ausgehend von CO₂ synthetisiert werden. Auch könnte CO₂ als Elektronenakzeptor dienen, wenn der Wasserstoff-Partialdruck zu hoch ist. Andererseits wird Formiat oxidiert, um die Reduktasesysteme mit Reduktionsäquivalenten zu versorgen. Die Formiat-Dehydrogenase aus *E. acidaminophilum* kann bei 34 °C die Oxidation von Formiat mit einer sehr hohen spezifischen Aktivität von bis zu 1.400 U/mg katalysieren, sie erreicht dabei Wechselzahlen von 4.200 s⁻¹. Dieser scheinbare Widerspruch zu der Hypothese, nach der W-abhängige Enzyme signifikante Katalyseraten in Sauerstoff-Transfer-Reaktionen nur bei hohen Temperaturen erreichen können sollten, lässt sich dadurch erklären, dass Formiat-Dehydrogenasen Oxidationen ohne Sauerstoff-Transfer katalysieren. KHANGULOV et al. (1998) konnten durch massenspektrometrische Untersuchungen nachweisen, dass die Formiat-Dehydrogenase keine klassische Oxotransferase wie die anderen Mitglieder der DMSO-Reduktase-Familie ist (untersucht wurde Fdh-H von *E. coli*). Oxotransferasen übertragen ein Sauerstoff-Atom aus Wasser auf das Produkt, im Falle der Formiat-Dehydrogenase würde als primäres Produkt Bicarbonat entstehen:



Durch Oxidation von ¹³C-markiertem Formiat in ¹⁸O-angereichertem Wasser durch FDH-H von *E. coli* wurde ¹³CO₂ gebildet, das keine ¹⁸O-Markierung enthielt. Somit wurde bewiesen, dass CO₂ und nicht Bicarbonat das primäre Produkt der Formiat-Oxidation darstellt, und die Reaktion nach folgender Gleichung abläuft:



Auch für die Formiat-Dehydrogenasen aus *C. pasteurianum* und *W. succinogenes* wurde CO₂ als unmittelbares Reaktionsprodukt bzw. -edukt identifiziert (THAUER et al. 1975; KRÖGER 1975) sowie für die FMDH aus *Methanosarcina barkeri*, die eine der CO₂-Reduktion der Formiat-Dehydrogenase ähnliche Reaktion katalysiert (VORHOLT UND THAUER 1997). Somit kann sowohl für Formiat-Dehydrogenase (einschließlich der Formiat-Dehydrogenasen von *E. acidaminophilum*) als auch für FMDH festgestellt werden, dass diese Proteine unter den Molybdopterin-haltigen Enzymen eine Ausnahme in Bezug auf den Reaktionsmechanismus darstellen.

Tabelle 10: Redoxpotentiale einiger von ausgewählten Molybdän- und/oder Wolfram-haltigen Enzymen katalysierten Reaktionen

Enzym	Redoxpaar	E'₀ (V) ¹
Aldehyd-Oxidoreduktase	Acetaldehyd/Acetat	-0,58
Formyl-Methanofuran-DH	CO ₂ /Formylmethanofuran	-0,50
Formiat-Dehydrogenase	CO ₂ /Formiat	-0,43
TMAO-Reduktase	(CH ₃) ₃ NO/(CH ₃) ₃ N	+0,13
DMSO-Reduktase	(CH ₃) ₂ SO/(CH ₃) ₂ S	+0,16
Nitrat-Reduktase	NO ₃ ⁻ /NO ₂ ⁻	+0,43
Sulfit-Oxidase	Sulfit/Sulfat	+0,52

¹ aus THAUER et al. 1977 bzw. BUC et al. 1999

Wie bereits erwähnt, gibt es sowohl Wolfram- als auch Molybdän-abhängige Formiat-Dehydrogenasen, ebenso sind von der Formylmethanofuran-Dehydrogenase Isoenzyme bekannt, die entweder Mo oder W enthalten. Jedoch ist bisher keine Formylmethanofuran-Dehydrogenase aus einem hyperthermophilen Organismus bekannt, die auch mit Molybdän Aktivität aufweist. Weitaus häufiger aber sind Berichte über Mo-abhängige Enzyme, die ihre Aktivität verlieren, wenn das Molybdän gegen Wolfram substituiert wird (KLETZIN UND ADAMS 1996). So wird z. B. in die Nitrat-Reduktase W eingebaut, das Enzym ist jedoch inaktiv. Die W-substituierte, ebenfalls inaktive Sulfit-Oxidase (W-SOX) wurde intensiv mittels EPR-Spektroskopie und Deuterium-Experimenten untersucht und mit aktiver Mo-Sulfit-Oxidase verglichen. Es zeigte sich, dass das aktive Zentrum der W-SOX sich nicht von Mo-SOX unterschied. Für die Unfähigkeit der W-SOX, Sulfit zu oxidieren, wurde das im Vergleich zum Mo(IV/V)-Paar wesentlich niedrigere Redoxpotential des W(IV/V)-Paares verantwortlich gemacht. Diese Ergebnisse stützen wiederum obengenannte Hypothese, dass W-Enzyme keine Reaktionen mit hohem Redoxpotential wie Nitrat-Reduktion oder Sulfit-Oxidation ausführen können (Tabelle 10). Der W-abhängige *Pyrobaculum aerophilum* nutzt auch bei relativ hohen Wolfram-Konzentrationen Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor (AFSHAR et al. 1998). Bei Wolfram-Konzentrationen, die optimales Wachstum zur Folge hatten,

war jedoch die spezifische Aktivität der Nitrat-Reduktase niedriger als bei suboptimalen Wolframat-Konzentrationen. Die Autoren gehen daher davon aus, dass es sich bei der Nitrat-Reduktase um ein Molybdän-abhängiges Enzym handelt, sich der Organismus aber an Umgebungen mit hohem Wolframat-Gehalt adaptiert hat und durch einen unbekanntem Mechanismus die Nitrat-Reduktase vor dem Einbau von Wolfram schützt.

Auch neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Austausch von Mo durch W zur Änderung des Redoxpotentials des aktiven Zentrums führt, wodurch die Katalyse beeinflusst wird. Dies kann sich in der Bevorzugung einer Reaktionsrichtung äußern. Als erste Molybdän-abhängige Enzyme konnten die TMAO-Reduktase aus *E. coli* (BUC et al. 1999) und die DMSO-Reduktase aus *Rhodobacter capsulatus* (STEWART et al. 2000) als aktive Wolfram-substituierte Enzyme gereinigt werden. Die W-substituierte DMSO-Reduktase (W-DMSOR) wurde durch Röntgenkristallstrukturanalyse sowie EPR-Spektroskopie untersucht und mit Mo-DMSOR verglichen. Weder Tertiärstruktur, Aufbau des aktiven Zentrums, noch die erhaltenen EPR-Signale wichen wesentlich voneinander ab. Jedoch zeigten sich Unterschiede in der katalytischen Aktivität. So wies W-DMSOR eine signifikant höhere spezifische Aktivität für die DMSO-Reduktion auf, war aber nicht mehr zur Katalyse der DMS-Oxidation befähigt. Mittels Redox-Titration wurden die mittleren Redoxpotentiale E'_0 der Mo(VI/V)- und Mo(V/IV)-Paare der Mo-DMSOR auf +141 mV bzw. +200 mV bestimmt, die der W(VI/V)- und W(V/IV)-Paare der W-DMSOR jedoch auf -203 mV bzw. -105 mV. Im Vergleich zu Mo-DMSOR, nimmt W-DMSOR daher leichter die oxidierten Zustände (+VI und +V) ein, W(IV) ist daher ein besseres Reduktionsmittel als Mo(IV). Umgekehrt ist W(VI) ein schlechteres Oxidationsmittel als Mo(VI), was sich bei der W-DMSOR darin äußert, dass sie die Oxidation von DMS zu DMSO nicht mehr katalysiert.

Die W-substituierte TMAO-Reduktase aus *E. coli* konnte ebenfalls aktiv gereinigt werden (BUC et al. 1999). Sie zeichnete sich im Vergleich zu Mo-TMAOR durch eine erhöhte Resistenz gegenüber hohen Temperaturen und Ionenstärken aus, erwies sich aber als sensitiver gegenüber hohen pH-Werten. Das Temperaturoptimum der W-TMAOR war erhöht, die Reaktionsgeschwindigkeit (bei gleicher Reaktionstemperatur) in der Umwandlung von TMAO zu TMA war niedriger und das Enzym war Sauerstoffempfindlicher. Außerdem erweiterte sich das Substratspektrum, neben TMAO und anderen N-Oxiden konnten auch Sulfoxide wie DMSO umgesetzt werden. Wie der Austausch des Metalls auf die Substratspezifität einwirkt, ist noch nicht geklärt.

Im Gegensatz dazu, und vereinbar mit der oben genannten Theorie, gelang es bisher nicht, Wolfram in den Wolfram-abhängigen Enzymen (AOR, FOR, GAPOR) von *P. furiosus* durch Molybdän zu ersetzen (MUKUND UND ADAMS 1996). Der Organismus wurde in Gegenwart von Molybdän angezogen und die Enzyme gereinigt. Nach Bestimmung des Metallgehalts der Enzyme zeigte sich, dass sie in geringen Mengen, aber ausschließlich Wolfram enthielten, wodurch auch die Restaktivitäten erklärt werden können. Daher besteht auch die Möglichkeit, dass das Molybdän gar nicht erst in die Zelle aufgenommen

wird. Im Gegensatz zu dem Aufnahmesystem von *E. coli*, das zwischen Molybdat und Wolframat nicht zu differenzieren vermag (RECH et al. 1996), besitzt z. B. *E. acidaminophilum* einen für Wolframat hochspezifischen ABC-Transporter (MAKDESSI 2000). Neben den beiden Formiat-Dehydrogenasen besitzt der Organismus eine W-abhängige AOR, die hohe Homologien zu der von *P. furiosus* aufweist (RAUH 2000). Bisher konnten aus *E. acidaminophilum* keine Mo-haltigen Enzyme isoliert werden. Jedoch konnte im Rohextrakt aus Glycin-gewachsenen Zellen eine deutliche NADP-abhängige Xanthin-Dehydrogenase-Aktivität gemessen werden (ZINDEL et al. 1988). Bisher ist (noch) keine Wolfram-abhängige Xanthin-Dehydrogenase bekannt.

Interessant erscheint die Tatsache, dass sofern ein Organismus W- als auch Mo-abhängige Aktivität eines Enzyms besitzt, immer W- bzw. Mo-abhängige Isoenzyme ausgeprägt werden und nicht einfach das Metall im aktiven Zentrum des Enzyms ersetzt wird. Daher kann angenommen werden, dass es in solchen Organismen auch zwei verschiedene Proteine gibt, die das Metall in das Apoprotein einbauen und durch irgendeinen dort verschlüsselten Hinweis erkennen, welches Metall eingebaut werden muss. Organismen, die strikt von nur einem Metall abhängig sind, wie z. B. *P. furiosus* von Wolfram, besitzen möglicherweise nur die W-spezifische Variante dieses Proteins, so dass die W-abhängigen Enzyme zwar mit Cofaktor gebildet werden, aber kein anderes Metall eingefügt werden kann.

Interessanterweise konnte aus *D. gigas* eine Formiat-Dehydrogenase gereinigt werden (ALMENDRA et al. 1999), die nicht Sauerstoff-empfindlich war, obwohl sie sowohl Wolfram als auch Selen enthält (S. MACIEIRA, pers. Mitteilung). Die Formiat-Dehydrogenase weist eine, verglichen mit der der Formiat-Dehydrogenase aus *E. acidaminophilum* oder *M. thermoacetica*, relativ geringe spezifische Aktivität von 34,1 U/mg auf. Dieses Protein wird zur Zeit kristallisiert, sowie die Gensequenz ermittelt. Die bisher bekannte Sequenz der katalytischen Untereinheit zeigt die höchsten Homologien zu FdnG und FdoG von *E. coli* (S. MACIEIRA, pers. Mitteilung). Die Formiat-Dehydrogenase aus *D. gigas* besitzt eine heterodimere Struktur und weist im Unterschied zu FDH-N und FDH-O von *E. coli* keine Häm-enthaltene dritte Untereinheit auf. Wenn die Strukturdaten dieser Formiat-Dehydrogenase vorliegen, wäre vielleicht eine Aussage über die Ursache der Sauerstoff-Stabilität möglich.

4.6 Die Rolle von Selen

Das Wachstum von *E. acidaminophilum* ist je nach Medium mehr oder weniger stark Selen-abhängig. Auch bei der Umsetzung des Serins ist mit der Formiat-Dehydrogenase ein Selenoenzym beteiligt, obwohl bei Versuchen zur Selen-Limitierung in Serin-Medium keine Reduzierung des Wachstums festgestellt wurde (ZINDEL et al. 1988). Im Vergleich zu den Selenoproteinen der Reduktase-Systeme besitzt die Formiat-Dehydrogenase nur einen geringen Anteil am Gesamtprotein, so dass vermutlich bereits sehr

geringe Mengen an Selen ausreichen. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch durch GRANDERATH (1993) in Bezug auf eine Wolframat-Limitierung erhalten werden.

Manche Organismen passen sich an eine möglicherweise auftretende Selen-Limitierung im Habitat durch eine doppelte Ausstattung der entsprechenden katalytischen Untereinheiten in Form von Selenocystein bzw. Cystein-haltigen Isoenzymen an. So besitzt z. B. auch *Methanopyrus kandleri* zwei Gene für Selenocystein- und Cystein-haltige Isoenzyme der katalytischen Untereinheit der Formylmethanofuran-Dehydrogenase. Während die Gene für die Selen-abhängige Formylmethanofuran-Dehydrogenase konstitutiv transkribiert werden, wird das Gen für die Selen-unabhängige Formylmethanofuran-Dehydrogenase nur in Abwesenheit von Selen exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der Selen-freien Variante um ein Ersatzenzym handelt. Auch ist das Selen-haltige Enzym katalytisch effizienter, was in kürzeren Verdopplungszeiten bei Anwesenheit von Selen zum Ausdruck kommt (VORHOLT et al. 1997).

Der Einfluss von Selenocystein im Vergleich zu Cystein auf die Katalyse der Formiat-Oxidation wurde für FDH-H aus *E. coli* untersucht. Die Cystein-Mutante des Proteins wies nur 0,3 % der Aktivität des Wildtyp-Enzyms auf (AXLEY et al. 1991), die Serin-Mutante war gänzlich inaktiv (ZINONI et al. 1987). Durch Röntgenstrukturanalyse der FDH-H von *E. coli* (BOYINGTON et al. 1997) sowie EPR-Untersuchungen (KHANGULOV et al. 1998) wurden starke Hinweise erhalten, dass die deprotonierte Selenolgruppe als Ligand des Molybdäns dient und während der Katalyse das α -Proton auf einen Protonenakzeptor überträgt, mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich dabei um His-141 (s. 4.2, Abb. 4.3). Bei physiologischen pH-Werten liegt die Selenolgruppe des Selenocysteins aufgrund des im Vergleich zu Cystein niedrigeren pK_A -Werts ($pK_A(\text{Cys}) \geq 8$; $pK_A(\text{SeCys}) = 5,2$) vorwiegend deprotoniert, die Thiolgruppe des Cystein jedoch protoniert vor. Während die Ligation des Molybdäns möglicherweise auch durch eine Thiolgruppe übernommen werden kann, kann die Funktion des Selenol-Anions als Protonenüberträger nur von der deprotonierten Form der Thiolgruppe übernommen werden. Durch den hohen pK_A -Wert der Thiolgruppe bedingt, verläuft die Übertragung des Protons auf His-141 langsamer, da die Affinität des Thiolat-Anions zu dem Proton, verglichen mit der des Selenol-Anions, wesentlich höher ist.

Nun weisen viele katalytische Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenasen vorwiegend aerober Bakterien wie z. B. *R. eutropha* (OH UND BOWIEN 1998), aber auch anaerober Organismen wie z. B. *M. formicicum* (SHUBER et al. 1986) im aktiven Zentrum Cystein auf, ohne dass die katalytische Effizienz wesentlich beeinträchtigt wäre. So ist der k_{cat} -Wert der S-FDH von *R. eutropha* mit 338 s^{-1} (FRIEDEBOLD 1994) zwar um eine Größenordnung niedriger als der der FDH-II von *E. acidaminophilum* (4.222 s^{-1}). Der k_{cat} -Wert der Cystein-Mutante der FDH-H von *E. coli* war jedoch im Vergleich zum Wildtyp-Enzym um fast drei Größenordnungen geringer (9 s^{-1} gegenüber 2.800 s^{-1} ; AXLEY et al. 1991). Daher ist davon auszugehen, dass das aktive Zentrum der Selen-unabhängigen Formiat-Dehydrogenasen im Vergleich zu denen der Selen-abhängigen Enzyme gewisse Variationen aufweist, die eine Katalyse mit Hilfe eines Cysteins erleichtern, indem z. B. die deprotonierte Form der Thiolgruppe stabilisiert wird. Da bisher kein

Organismus bekannt ist, der Selen-abhängige und Selen-unabhängige Isoenzyme der Formiat-Dehydrogenase besitzt, würde sich für eine weitergehende Untersuchung dieser Problematik die der Formiat-Dehydrogenase verwandte Formylmethanofuran-Dehydrogenase aus *M. kandleri* besser eignen. Die katalytischen Untereinheiten der Selen-abhängigen und der Selen-unabhängigen Form weisen eine Identität von 89 % auf (VORHOLT et al. 1997). Bisher wurden jedoch keine biochemische Charakterisierung der beiden Isoenzyme vorgenommen.

E. acidaminophilum besitzt außer den beiden Formiat-Dehydrogenasen noch eine ganze Reihe weiterer Selenoproteine, so Protein A sowie eine Untereinheit von Protein B der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase (WAGNER et al. 1999, SONNTAG 1998; MEYER et al. 1995), Selenophosphat-Synthetase (GURSINSKY et al. 2000), eine Peroxidase (PARTHER 1998; WAGNER 1997) und PrpU, ein 10 kDa-Protein, das möglicherweise im Zusammenhang mit der Glycin-Decarboxylase steht (LECHEL 1999; WAGNER 1997). In Rohextrakten von mit ^{75}Se angezogenen Zellen wurden weitere Signale erhalten, die keinen bisher bekannten Selenoproteinen zugeordnet werden konnten (WAGNER 1997). Da in diesen Experimenten die Formiat-Dehydrogenasen von *E. acidaminophilum* nicht detektiert werden konnten, wäre es denkbar, dass weitere Selenoproteine existieren, die wie die Formiat-Dehydrogenasen nur einen geringen Anteils am Gesamtprotein besitzen und bisher nicht identifiziert wurden. Damit ist *E. acidaminophilum* das Bakterium, in dem bislang mit Abstand die meisten Selenoproteine gefunden wurden. Bisher wurde für keines der bekannten Selenoproteine ein Selen-freies Isoenzym identifiziert. Daher kann angenommen werden, dass *E. acidaminophilum* strikt Selen-abhängig ist und als Anpassung an Selen-Limitierung möglicherweise ein sehr effizientes Selenit-Aufnahmesystem besitzt.

4.7 Was braucht eine Formiat-Dehydrogenase um CO_2 reduzieren zu können?

Wie in 4.5 bereits beschrieben wurde, können Reaktionen mit niedrigem Redoxpotential besser mit Wolfram als mit Molybdän im aktiven Zentrum ablaufen können.

Aus verschiedenen Gram-positiven Anaerobiern (*E. acidaminophilum*, *C. formicoaceticum*, *M. thermoacetica*) sind Formiat-Dehydrogenasen bekannt, die CO_2 zu reduzieren vermögen und Wolfram und Selen im aktiven Zentrum besitzen (diese Arbeit; LEONHARDT UND ANDREESEN 1977; YAMAMOTO et al. 1983). Aus *C. pasteurianum* ist eine „ CO_2 -Reduktase“ bekannt, die Molybdän und kein Selen aufweist (THAUER et al. 1973). Die Formiat-Hydrogen-Lyase aus *M. formicicum*, die aus einer F_{420} -abhängigen Formiat-Dehydrogenase und einer F_{420} -abhängigen Hydrogenase besteht, kann Formiat reversibel zu CO_2 und H_2 umsetzen (BARON UND FERRY 1989). Die Formiat-Dehydrogenase weist Molybdän und kein Selen auf. Andererseits wurde z. B. für die S-FDH von *R. eutropha* beschrieben, die ebenfalls Molybdän und kein Selen aufweist, dass sie kein CO_2 reduzieren kann (FRIEDEBOLD UND BOWIEN 1993). Welche

Kriterien muss also eine Formiat-Dehydrogenase erfüllen, damit sie die thermodynamisch ungünstige CO₂-Reduktion zu katalysieren vermag?

Zur Annäherung an die Antwort ist der Vergleich von Nitrat-Reduktase und Formiat-Dehydrogenase sehr interessant. Die beiden Enzyme gehören zur Familie der DMSO-Reduktase (s. 4.5) und weisen viele Ähnlichkeiten auf, trotzdem katalysieren sie Reaktionen mit sehr unterschiedlichen Redoxpotentialen (Tabelle 10).

Die periplasmatische dissimilatorische Nitrat-Reduktase aus *D. desulfuricans* ATCC 27774 ist der FDH-H von *E. coli* sehr ähnlich. Die Primärsequenz weist eine Sequenzhomologie von 33 % Identität sowie 43 % Ähnlichkeit auf und verfügt über die gleichen Cofaktoren (zwei MGDs, die an der Bindung des Molybdäns beteiligt sind, sowie ein [4Fe-4S]-Cluster). Beide Enzyme wurden röntgenkristallographisch untersucht (BOYINGTON et al. 1997; DIAS et al. 1999). Dabei zeigte sich, dass die Tertiärstruktur der beiden Proteine nahezu identisch ist (DIAS et al. 1999). Der für die Formiat-Dehydrogenase postulierte Elektronenfluss vom Mo über das MPT und Lys-44 auf das [4Fe-4S]-Zentrum könnte so, nur in umgekehrter Richtung, auch bei der Nitrat-Reduktase erfolgen, da das Lys-44 auch bei Nitrat-Reduktasen konserviert ist (s. 4.2). Veränderungen weist das aktive Zentrum auf. Anstelle des bei allen Formiat-Dehydrogenasen konservierten His-141 befindet sich bei der Nitrat-Reduktase ein Methionin, und statt des an der Substratbindung beteiligten Arg-333 ein Threonin.

Die Ähnlichkeit der beiden Enzyme kommt auch dadurch zum Ausdruck, dass beide das Substrat des jeweils anderen Enzyms umsetzen können. Die Nitrat-Reduktase weist eine sehr geringe, aber messbare spezifische FDH-Aktivität von $0,8 \times 10^{-3}$ U/mg gegenüber einer Nitrat-Reduktase-Aktivität von 18,6 U/mg auf (BURSAKOV et al. 1997). Die aus dem gleichen Organismus isolierte Formiat-Dehydrogenase besitzt eine spezifische FDH-Aktivität von 78 U/mg und kann gleichfalls die Reduktion von Nitrat zu Nitrit katalysieren, wenn auch mit einer sehr geringen spezifischen Aktivität von $1,33 \times 10^{-4}$ U/mg (COSTA et al. 1997). Der von DIAS et al. (1999) vorgeschlagene Reaktionsmechanismus der Nitrat-Reduktase geht von einer Ausgangslage aus, in der das Molybdän durch die Dithiolen-Schwefel-Atome der beiden Cofaktoren sowie durch die Seitenkette des Cys-140 5-fach koordiniert in der Oxidationsstufe +IV vorliegt. Nitrat wird von dem Mo(IV) gebunden, wodurch die N-O-Bindung geschwächt wird und das Produkt Nitrit freigesetzt wird. In diesem Stadium liegt das Molybdän in der Oxidationsstufe +VI vor und verfügt über einen Oxo-Liganden, der aus dem Nitrat stammt. Nachfolgend werden auf den Oxo-Liganden zwei Protonen übertragen, was zur Bildung eines Wasser-Moleküls führt, sowie zwei Elektronen auf das Mo(VI), so dass nach Abdissoziation des Wasser-Moleküls der Ausgangszustand wiederhergestellt ist. Beim Vergleich der vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen für Nitrat-Reduktase und Formiat-Dehydrogenase (s. 4.2) fällt zunächst auf, dass es sich im Gegensatz zur Formiat-Dehydrogenase bei der Nitrat-Reduktase um eine klassische Oxotransferase handelt (s. 4.5). Die unterschiedlichen Reaktionsfolgen spiegeln sich zwangsläufig auch in dem Aufbau der aktiven Zentren wider. Der größte Unterschied zwischen den Reaktionen von Nitrat-Reduktase und Formiat-Dehydrogenase liegt aber in der bevorzugten Reaktionsrichtung der Enzyme. Während die Formiat-Dehydrogenase die

Oxidation von Formiat katalysiert und das Enzym dementsprechend am Anfang des Reaktionszyklus oxidiert vorliegt, katalysiert die Nitrat-Reduktase die Reduktion ihres Substrates Nitrat und das Enzym liegt zu Beginn reduziert vor.

Formiat kann von der Nitrat-Reduktase nur dann umgesetzt werden, wenn der Reaktionszyklus nicht mit einem Mo(IV), sondern wie bei der Formiat-Dehydrogenase mit Mo(VI) beginnt. Der umgekehrte Fall tritt ein, wenn eine Formiat-Dehydrogenase als Nebenreaktion Nitrat zu Nitrit umsetzen soll, das Molybdän müsste statt im oxidierten +VI- im reduzierten +IV-Zustand vorliegen. Die Umsetzung des Nitrats entspräche demzufolge der Rückreaktion der normalen Formiat-Oxidation, Nitrat stellt im Prinzip also ein Produktanalogon dar. Wenn nun also eine Formiat-Dehydrogenase die Reduktion eines Produktanalogons wie Nitrat katalysieren kann, sollte sie theoretisch auch die Reduktion des eigentlichen Produkts, d. h. eine CO₂-Reduktion katalysieren können.

Die Aktivität der Formiat-Dehydrogenase lässt sich in vielen Fällen durch Nitrat- oder Azid-Ionen stabilisieren (GRANDERATH 1993; FRIEDEBOLD UND BOWIEN 1993; AXLEY ET AL. 1991; YAMAMOTO et al. 1983). Beide Substanzen gelten als Strukturanaloga des Übergangszustands des Formiats (LJUNGDAHL UND ANDREESEN 1978; BLANCHARD UND CLELAND 1980). Untersuchungen zum Einfluss der als kompetitive Inhibitoren wirkenden Nitrat- und Azid-Ionen auf die Aktivität der FDH-I von *E. acidaminophilum* hatten gezeigt, dass diese durch Azid wesentlich stärker gehemmt wurde als durch Nitrat. Bei Einsatz von je 5 mM wurden mit Azid nur 15 %, mit Nitrat aber 73 % Restaktivität mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor gemessen (GRANDERATH 1993). Beide Substanzen vermindern die Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber Sauerstoff. Dieser Effekt war bei Azid stärker ausgeprägt, weswegen Azid zur Stabilisierung der Formiat-Dehydrogenase bei der Anreicherung eingesetzt wurde. Weder die FDH-I noch die FDH-II wurden darauf untersucht, ob sie eine spezifische Nitrat-Reduktase-Aktivität wie die Formiat-Dehydrogenase aus *D. desulfuricans* besitzen. Unter dem Aspekt, dass Nitrat vielleicht langsam durch die Formiat-Dehydrogenase umgesetzt werden kann, ist die geringe Hemmung durch Nitrat erklärbar. Möglicherweise werden Formiat-Dehydrogenasen, die auch die der Nitrat-Reduktion eher verwandte CO₂-Reduktion nachweisbar katalysieren können, weniger stark durch Nitrat gehemmt. Für die S-FDH aus *R. eutropha*, für die bisher keine CO₂-Reduktion nachgewiesen werden konnte, wurde beschrieben, dass sie durch Nitrat stärker gehemmt wurde als durch Azid (FRIEDEBOLD 1994).

Die Formiat-Dehydrogenase verfügt wie alle Mitglieder der DMSO-Reduktase-Familie über zwei Pterincofaktoren, die mit je zwei cis-Dithiolen-Schwefelatomen das Molybdän komplexieren. Der fünfte Ligand ist das Selen des Selenocysteins (bzw. der Schwefel eines Cysteins in den Selen-freien Formiat-Dehydrogenasen), die sechste Koordinationsstelle wird wahrscheinlich durch eine Hydroxylgruppe besetzt. An dem nach der Formiat-Oxidation erfolgenden Elektronenfluss vom Mo(VI) über das MPT, ein Wasser-Molekül und die ε-Aminogruppe des Lys-44 auf das S1 des [4Fe-4S]-Clusters ist theoretisch nur ein Cofaktor notwendig (MPT 802 bei *E. coli*). Um die endergone Rückreaktion, also die CO₂-

Reduktion, zu erleichtern, wäre vorstellbar, dass gleichzeitig zwei Elektronen auf das Molybdän bzw. das Wolfram übertragen werden müssen, dass eine sukzessive Elektronenzuleitung wie es im umgekehrten Falle der Formiat-Oxidation geschehen würde, nicht ausreicht. In diesem Falle wäre vorstellbar, dass über beide Cofaktoren je ein Elektron angeliefert wird, das entsprechend auch von zwei verschiedenen [4Fe-4S]-Zentren kommt. FDH-H von *E. coli* weist nur ein [4Fe-4S]-Zentrum auf, während Formiat-Dehydrogenasen, die die Rückreaktion mit hohen Umsatzraten katalysieren können, meist im erweiterten N-terminalen Bereich über weitere Eisen-Schwefel-Zentren verfügen. Für den Elektronentransport müsste zwischen dem Cofaktor und dem Eisen-Schwefel-Zentrum vermutlich auch eine elektronenleitende Aminosäure vorhanden sein, die die Aufgabe des Lys-44 übernehmen würde. Mögliche Kandidaten wären z. B. Arg-48, Arg-85, Lys-146 oder Arg-155 (Numerierung nach FdhA1).

Nun verfügt auch die S-FDH von *R. eutropha* über die zusätzlichen Eisen-Schwefel-Cluster, kann aber kein CO₂ reduzieren (FRIEDEBOLD UND BOWIEN 1993). Möglicherweise waren aber auch die Bedingungen für eine CO₂-Reduktion nicht optimal, da mit 2 mM NADH (Endkonzentration) relativ viel Elektronendonator eingesetzt wurde. Für die Messung der CO₂-Reduktion der FDH-II von *E. acidaminophilum* wurde 0,15 mM reduziertes Methylviologen eingesetzt, bei Einsatz von 6 mM war keine Reaktion zu verzeichnen. Auch wenn die Reaktion mit Substrat gestartet wurde, war keine Aktivität messbar, es musste mit Enzym gestartet werden; bei der Formiat-Oxidation gab es im Unterschied dazu keine Präferenz, ob mit Enzym oder mit Substrat gestartet wurde. Für die erfolgreiche Messung der CO₂-Reduktion der NADPH-abhängigen Formiat-Dehydrogenase aus *M. thermoacetica* wurde NADPH ebenfalls in einer Endkonzentration von nur 0,3 mM eingesetzt (YAMAMOTO et al. 1983). Auch für die der S-FDH verwandten Formiat-Dehydrogenase aus *Methylosinus trichosporium* konnte keine CO₂-Reduktion beobachtet werden, wobei 10 mM NADH zum Einsatz kamen (JOLLIE UND LIPSCOMB 1991). Jedoch konnte eine CO₂-Reduktion für die Formiat-Dehydrogenase von *Pseudomonas oxalaticus* gefunden werden, obwohl diese Formiat-Dehydrogenase denen aus *R. eutropha* und *M. trichosporium* ähnlich ist (MÜLLER et al. 1978).

Für die F₄₂₀-abhängige Formiat-Dehydrogenase aus *M. formicicum*, die wie FDH-H aus *E. coli* in der katalytischen Untereinheit nur über ein [4Fe-4S]-Zentrum verfügt, konnte eine reversible Formiat-Hydrogen-Lyase-Aktivität gemessen werden, entsprechend einer CO₂-Reduktion der beteiligten Formiat-Dehydrogenase (BARON UND FERRY 1989). Die freie Energie der Gesamtreaktion ist für die Bildung von Formiat aus CO₂ und H₂ leicht endergon ($\Delta G'_0 = +3,86$ kJ), aber vergleichbar der Umsetzung von Formiat zu H₂ und CO₂ ($\Delta G'_0 = -3,86$ kJ). Interessant wäre daher, ob die F₄₂₀-abhängige Formiat-Dehydrogenase auch allein zur CO₂-Reduktion fähig wäre, ohne dass eine parallel verlaufende exergone Reaktion die Reduktion erleichtert.

Im Falle der Formiat-Dehydrogenasen von *E. acidaminophilum*, die beide Reaktionen katalysieren können, kann vermutet werden, dass sich das Enzym nach dem Redoxzustand der Zelle richtet. Ist Formiat

vorhanden und die Elektronen werden von der Glycin-, Betain- oder Sarkosin-Reduktase verbraucht, liegt das Wolfram in dem oxidierten +VI-Zustand vor. Liegen keine reduzierbaren Substrate vor, wird die Formiat-Dehydrogenase vermutlich von Enzymen wie der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase mit Elektronen „vollgepumpt“, so dass auch das Wolfram reduziert vorliegt und bei Vorhandensein von CO₂ dieses reduziert.

Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass eine Formiat-Dehydrogenase mit nur einem [4Fe-4S]-Zentrum sowie Molybdän und Cystein im aktiven Zentrum theoretisch auch die CO₂-Reduktion katalysieren kann, wie die Formiat-Dehydrogenase aus *M. formicicum* beweist, aber nicht mit hohen Umsatzraten. Diese z. B. bei acetogenen Bakterien zum Wachstum auf H₂ und CO₂ notwendigen hohen Stoffumsätze werden erst durch das Vorkommen von Wolfram, Selen und zusätzlichen Eisen-Schwefel-Zentren im Enzym erreicht, wodurch die Effizienz der CO₂-Reduktion wesentlich erhöht wird.

4.8 Aufbau eines Transformationssystems für *E. acidaminophilum*

Viele weiterführende Untersuchungen zur Struktur und Wirkung von Enzymen oder Genregulation setzen die genetische Manipulierbarkeit eines Organismus voraus. Auch die weitere Charakterisierung der Selenoproteine von *E. acidaminophilum* einschließlich der Formiat-Dehydrogenase, zu deren nativer Überexpression bisher kein System vorliegt, würde durch die Transformierbarkeit des Organismus erleichtert, indem z. B. gezielt Mutationen in Proteine eingeführt werden könnten, um deren Auswirkungen auf die Aktivität oder Stabilität des Proteins untersuchen zu können. Gene unbekannter Funktion könnten deletiert werden, um Hinweise auf ihre Funktion zu erhalten. Auch zur Klärung der Frage, ob es sich bei den Promotoren der FDH-I von *E. acidaminophilum* und *C. sticklandii* (GRAENTZDOERFFER et al. 2000), deren Sequenzbereiche keine Ähnlichkeiten zu Konsensus-Sequenzen bekannter Promotoren aufweisen (WÖSTEN 1998), möglicherweise um einen neuen Promotortyp handelt, kann ein Transformationssystem genutzt werden, indem Promotorstudien auf Basis eines Genexpressions-Reportersystems betrieben werden können. Viele weitere Anwendungen sind denkbar.

Die im Laufe dieser Arbeit unternommenen Versuche zur Transformation von *E. acidaminophilum* mit verschiedenen Plasmiden durch Elektroporation waren bisher erfolglos. Trotzdem wurden wichtige Ergebnisse erzielt, die bei weiteren Experimenten berücksichtigt werden sollten.

Die Transformierbarkeit eines Organismus steht und fällt auch mit dem Vorhandensein eines Vektorsystems. Das Plasmid muss in dem neuen Wirt replizierfähig sein, d.h. einen Replikationsursprung (*origin*) besitzen, der in diesem Falle von *E. acidaminophilum* erkannt werden kann. Da in *E. acidaminophilum* keine Plasmide nachgewiesen werden konnten (SONNTAG 1998), muss auf Origins von Plasmiden anderer, möglichst verwandter Bakterien zurückgegriffen werden. Außerdem muss der Vektor eine Determi-

nante aufweisen, die die Selektion von transformierten gegenüber nicht-transformierten Zellen erlaubt. Üblicherweise werden zu diesem Zweck Resistenzdeterminanten gegenüber Antibiotika verwendet. Die Expression des entsprechenden codierenden Gens, sowie die Funktionalität in dem neuen Wirt ist die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Selektion. Die meist verwendeten Shuttle-Vektoren weisen zwei Resistenzdeterminanten, sowie zwei Origins auf, um Replikation und Selektion in *E. coli* sowie dem Gram-positiven Plasmid-Empfänger zu gewährleisten.

Zur Selektion sollte Tetracyclin verwendet werden, da *E. acidaminophilum* eine zum jetzigen Zeitpunkt unerklärliche Sensitivität gegenüber Erythromycin besitzt, so dass nicht gewährleistet wäre, dass die Ausprägung eines Resistenzgens Wirkung zeigen würde. Auch Chloramphenicol ist aufgrund der relativ hohen natürlichen Resistenz weniger geeignet.

Die bakteriostatische Wirkung des Tetracyclins erklärt sich durch eine reversible Inhibierung der Proteinbiosynthese durch Hemmung der Bindung des ternären Komplexes Aminoacyl-tRNA/EF-Tu/GTP an die 30S-ribosomale A-Seite des mRNA-70S-Ribosomenkomplexes in Abhängigkeit von der Konzentration der Mg^{2+} -Ionen (GRÄFE 1992). Drei verschiedene bakterielle Resistenzstrategien sind bekannt: Schutz des Ribosoms als Angriffspunkt des Antibiotikums, Reduktion der intracellulären Konzentration an Tetracyclin durch Efflux sowie Inaktivierung des Antibiotikums durch Modifizierung (SCHNAPPINGER UND HILLEN 1996). Resistenzdeterminanten gegen Tetracyclin in Gram-positiven Organismen basieren meist auf dem Schutz des Ribosoms, und sind oft auf mobilen genetischen Elementen wie Transposons, konjugativen Plasmiden oder konjugativen Transposons lokalisiert. Die Klasse der TetM-Proteine weist Sequenz-Ähnlichkeiten zu den Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G auf, besitzt GTPase-Aktivität und verleihen Resistenz durch reversible Bindung an das Ribosom. Das ursprünglich aus *E. faecalis* isolierte konjugative Transposon Tn916 (FRANKE UND CLEWELL 1981), das Tetracyclin-Resistenz durch die *tetM*-Determinante vermittelt, besitzt einen sehr weiten Wirtsbereich und konnte sowohl auf Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien übertragen werden (BERTRAM et al. 1991). Gerade auch in Clostridien konnten mit Tn916 und verwandten Transposons gute Erfolge erzielt werden (DÜRRE 1993). Daher sollten in Elektroporationsexperimenten mit *E. acidaminophilum* Plasmide verwendet werden, die eine *tetM*-Resistenzdeterminante besitzen.

Da *E. acidaminophilum* keine eigenen Plasmide aufweist, müssen Origins von Plasmiden anderer Gram-positiver Bakterien verwendet werden. Verwendet wurden bisher Vektoren mit Replikationsursprüngen von Plasmiden von *C. perfringens*, *C. butyricum*, sowie *B. subtilis* und *E. faecalis* (Tabelle 9). Die verwendeten Plasmide wiesen aber meist eine Resistenzdeterminante auf, deren Expression oder Funktion in *E. acidaminophilum* eher zweifelhaft ist, weswegen über ihre Replizierfähigkeit in *E. acidaminophilum* keine Aussage gemacht werden kann. Die Origins der clostridiellen Plasmide besitzen jedoch einen relativ eingeschränkten Wirtsbereich, so dass zumindest zu Beginn eher Plasmide verwendet werden sollten, die Origins mit weitem Wirtsbereich aufweisen, wie dies für den Origin von pIM13 aus *B. subtilis* sowie

pAM β 1 aus *E. faecalis* beschrieben ist. Der Wirtsbereich des Plasmidreplikons von pAM β 1 umfasst bisher die Gattungen *Acetobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus* und *Streptococcus* (STRÄTZ 1991; SWINFELD ET AL. 1990; TRIEU-CUOT ET AL. 1987; LEBANC UND LEE 1984). Mit pMS4 (STRÄTZ 1991) liegt ein Vektor vor, der ein pAM β 1-Replikon sowie die *tetM*-Resistenzdeterminante aufweist, und daher für weitere Versuche zur Elektroporation von *E. acidaminophilum* verwendet werden sollte.

Wirtsspezifische Restriktionsendonukleasen können ein erhebliches Hindernis einer Transformation durch Elektroporation darstellen. Aus *E. acidaminophilum* konnte die Restriktionsendonuklease *EacI* vom Typ IIS angereichert und kloniert werden. Die Bestimmung der Erkennungssequenz (5'-GGATC-3') zeigte jedoch, dass Plasmide, die aus *E. coli*-Stämmen isoliert werden, die über die *dam*-Methylase verfügen, vor dem Angriff des Enzyms geschützt sein sollten, da die *dam*-Methylase spezifisch das Adenin des Sequenzmotivs 5'-GATC-3' methyliert. Diese Annahme wurde experimentell bestätigt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass *E. acidaminophilum* über eine zweite Restriktionsendonuklease verfügt, die bisher nicht identifiziert wurde.

Die sehr hohen Überlebensraten von *E. acidaminophilum* bei den bisher durchgeführten Elektroporationsexperimenten deuten allerdings eher darauf hin, dass die gewählten Bedingungen nicht ausreichen, um die Cytoplasma-Membran zu schädigen. Dies ist insofern verwunderlich, da für die durch Elektroporation transformierten Clostridien wesentlich „schwächere“ Bedingungen ausreichen. So wurden für *C. acetobutylicum* eine Feldstärke von 5 kV/cm bei einer Kapazität von 25 μ F empfohlen (MERMELSTEIN et al. 1992). Für *C. perfringens* betrug die Überlebensrate bei einer Feldstärke von 6,25 kV/cm nur noch 18 % (ALLEN UND BLASCHEK 1988). Für *Acetobacterium woodii* wurde festgestellt, dass die Effizienz der Elektroporation bei einer Feldstärke von 10 kV/cm am höchsten war, die Überlebensrate betrug unter diesen Bedingungen 10 % (STRÄTZ 1991). Bei *E. acidaminophilum* reichten jedoch selbst 12,5 kV/cm nicht aus, um die Zellen sichtbar zu dezimieren.

Möglicherweise kann eine *surface layer* (S-Layer) die Elektroporation behindern. Eine *surface layer* ist eine parakristalline Schicht, die aus nur einer Sorte (Glyko-)Protein aufgebaut ist und die den äußeren Abschluss der Zelle zu ihrer Umgebung darstellt (Reviews: SÁRA UND SLEYTR 2000; SLEYTR UND BEVERIDGE 1999; BOOT UND POWWELS 1996; BEVERIDGE UND GRAHAM 1991; SLEYTR UND MESSNER 1988). Bei Gram-positiven Organismen ist die S-Layer der Peptidoglycan-Schicht aufgelagert und vermutlich durch ionische Wechselwirkungen der SLH-Domänen, die meist im N-terminalen Bereich der S-Layer-Proteine lokalisiert sind (ENGELHARDT UND PETERS 1998), an sekundäre Zellwandpolymere geknüpft. Bei Gram-negativen Bakterien ist die S-Layer der äußeren Membran aufgelagert und bei manchen Archaea stellt die S-Layer sogar die einzige Zellwand dar. Die Untereinheiten weisen Größen zwischen 40.000 und 200.000 Da auf und werden durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten, in Archaea wird die S-Layer möglicherweise durch zusätzliche Disulfidbrücken verstärkt. Mittels Elektronenmikroskopie konnten drei Grundtypen von S-Schicht-Gittern identifiziert werden:

schräge, quadratische und hexagonale. Eine „Elementarzelle“, d. h. die Grundeinheit des Gitters, die sich periodisch im Abstand weniger Nanometer wiederholt, besteht je nach Typ aus einer oder zwei (schräg), vier (quadratisch), drei oder sechs (hexagonal) identischen Untereinheiten (Abb. 4.6). Die Poren zwischen den Untereinheiten weisen – je nach Porendurchmesser – Ausschlussgrößen zwischen 15.000 und 40.000 Da auf. Die meisten aus ihrer natürlichen Umgebung isolierten Bakterien und Archaea besitzen eine S-Layer, viele verlieren sie aber durch Kultivierung im Labor. In Anbetracht der Tatsache, dass die S-Layer 10 –15 % des Gesamtproteins einer Zelle ausmachen kann und bei einer Generationszeit von 20 min in einer Zelle 500 S-Layer-Moleküle pro Sekunde synthetisiert werden müssen, ist nachvollziehbar, dass Mutanten im Vorteil sind, die die S-Layer nicht mehr exprimieren. *E. acidaminophilum* besaß bei seiner Isolierung eine hexagonale S-Layer (ZINDEL et al. 1988) und besitzt sie auch nach nahezu 15-jähriger Kultivierung im Labor immer noch, wie erneute elektronenmikroskopische Untersuchungen mittels Negativkontrastierung gezeigt haben (s. 3.6.6). Auch die verwandten Organismen *C. litorale* (FENDRICH et al. 1990) und *C. sticklandii* weisen S-Layer auf, letzterer verfügt über eine des quadratischen Typs (s. 3.6.6).

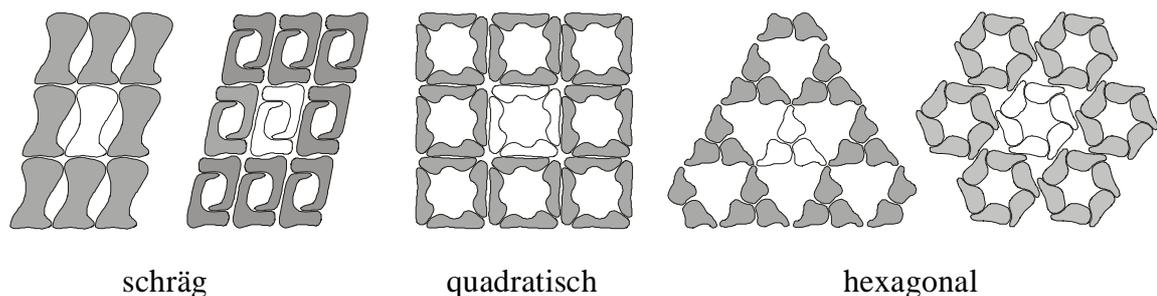


Abb. 4.6: Schematische Darstellung der drei Grundtypen von S-Layer-Schichten. Jeweils eine „Elementarzelle“ ist hervorgehoben.

Bedingt durch ihren gitterähnlichen Aufbau, weisen S-Layer die Eigenschaften eines Molekularsiebs auf. Daher ist durchaus vorstellbar, dass die S-Layer für Plasmide ein schwer überwindbares Hindernis darstellt. Untersuchungen zur Elektroporation des Wildtyps im Vergleich zu einer S-Layer-defizienten Mutante des Gram-negativen *Caulobacter crescentus* (GILCHRIST UND SMIT 1991) unterstützt die Hypothese, dass die S-Layer einen Einfluss auf die Transformation besitzt. Der Wildtyp wies nur 10 % der Transformationseffizienz der S-Layer-defizienten Mutante auf. *C. crescentus* weist eine hexagonale S-Layer mit ungewöhnlich großen Gitterabständen von 23,5 nm auf (gegenüber sonst 9 – 14 nm), so dass eine noch stärkere Beeinflussung bei niedrigerem Gitterabstand erwartet werden kann.

Möglicherweise stellt die S-Layer von *E. acidaminophilum* auch eine Ursache dafür dar, dass der Organismus gegenüber hohen Feldstärken immun erscheint. Eine erfolgreiche Elektroporation setzt voraus,

dass durch das anliegende Feld die Cytoplasma-Membran geschwächt wird und Poren entstehen, durch die ein Plasmid in die Zelle aufgenommen werden kann. Je höher die Feldstärke ist, desto mehr Poren entstehen und die Effizienz der Transformation steigt. Gleichzeitig nimmt die Überlebensrate der Zellen ab, da die Membran mancher Zellen irreparabel geschädigt wird, so dass die Zelle stirbt. Wenn durch eine hohe Feldstärke von 12,5 kV/cm die Überlebensrate wie bei *E. acidaminophilum* kaum beeinflusst wird, könnte dies darauf hinweisen, dass das Feld an der Cytoplasma-Membran gar nicht anliegt.

Biophysikalische Untersuchungen mit auf Tetraether-Lipidmembranen rekristallisierter S-Layer zeigten, dass die Leitfähigkeit senkrecht zu der Schicht (d. h. in Richtung der Poren) im Vergleich zu einer Tetraether-Lipidmembran ohne S-Layer herabgesetzt war (SCHUSTER et al. 1998). Dies könnte darauf hindeuten, dass die S-Layer zumindest einen Teil der Ladung abschirmt und diese nicht bis an die Membran gelangt. Von einer Zelle mit S-Layer könnten somit Parallelen zu einem Faraday-Käfig gezogen werden, mit dem sich Hohlräume gegen statische elektrische Felder abschirmen lassen. Nach den Gesetzen der Physik ändert sich die Feldstärke im Inneren des Faraday-Käfigs nicht, wenn ein äußeres Feld angelegt wird und die Oberfläche des Körpers leitend ist.

Werden diese Überlegungen berücksichtigt, erscheint zumindest erklärbar, warum *E. acidaminophilum* viel höhere Feldstärken verkraftet als Gram-Positive Bakterien ohne S-Layer wie *C. acetobutylicum* oder *C. perfringens*. Die höchste bisher verwendete Feldstärke betrug 12,5 kV/cm, durch Verwendung von Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 1 mm könnte sie bis auf 25 kV/cm erhöht werden. Wenn man die Möglichkeit in Betracht zieht, dass an der Cytoplasma-Membran nur ein Teil der Feldstärke wirkt, könnte die Erhöhung der Feldstärke eventuell einen positiven Effekt auf die Transformation besitzen, was zumindest in einer Abnahme der Überlebensrate deutlich werden sollte.

Wenn auch die technisch maximal erreichbare Feldstärke von 25 kV/cm keinen Effekt zeigt, müssen andere Methoden angewendet werden, um eine Aufnahme von DNA in die Zellen zu erreichen. Ein Ziel dieser Versuche sollte dann auch sein, eine S-Layer-defiziente Mutante herzustellen, um die Hypothese, dass die S-Layer Ursache an der Untransformierbarkeit von *E. acidaminophilum* durch Elektroporation sei, zu überprüfen. Grundvoraussetzung für die Herstellung einer S-Layer-defizienten Mutante ist die Klonierung und Sequenzierung des entsprechenden Gens.

Eine weitere Möglichkeit zum DNA-Transfer besteht in der Konjugation. Auch in Organismen, die S-Layer aufweisen, oder zumindest bei ihrer Isolierung aufwiesen, wie *C. difficile*, *C. botulinum*, *A. woodii* oder *Bacillus stearothermophilus* konnte DNA mittels Konjugation übertragen werden (MULLANY et al. 1994; LIN UND JOHNSON 1991; STRÄTZ 1991; NATARAJAN UND ORIEL 1991). Allerdings kann nicht mit letzter Gewissheit behauptet werden, dass die bei der Konjugation eingesetzten Stämme tatsächlich eine S-Layer aufwiesen, da dies für die Autoren nicht von Interesse war. In all diesen Experimenten kam das bereits am Anfang des Kapitels erwähnte streptokokkale konjugative Transposon Tn916 zur Anwendung. Erste Konjugationsexperimente mit *E. acidaminophilum* und zunächst *E. coli* als Donor

wurden bereits unternommen. In verschiedenen Ansätzen wurde versucht, das konjugative Transposon Tn916 bzw. das konjugative Plasmid pKV12 auf *E. acidaminophilum* zu übertragen. Das Plasmid pKV12 besitzt einen pAM β 1-Replikon sowie eine *tetM*-Resistenzdeterminante (STRÄTZ 1991). Da die Transferfrequenzen für eine Übertragung von einem Gram-negativen Donor auf einen Gram-positiven Rezipienten meist niedriger sind als zwischen zwei Gram-positiven Organismen (DÜRRE 1993), wurde außerdem *E. faecalis* als Donor eingesetzt. Bisher konnten keine Transkonjuganten erhalten werden. Möglicherweise könnte die Effizienz durch den Einsatz subinhibitorischer Tetracyclin-Konzentrationen während der Konjugation erhöht werden, wie dies für die konjugative Übertragung von Tn1545 von *E. faecalis* auf *Listeria monocytogenes* beschrieben wurde (DOUCET-POPULAIRE et al. 1991). Es kann jedoch nicht entgültig ausgeschlossen werden, dass die S-Layer nicht auch einen inhibitorischen Einfluss auf die Effizienz einer Konjugation besitzt.

Könnte Tn916 erfolgreich in *E. acidaminophilum* konjugiert werden, könnte das Transposon als Vektor für Gene genutzt werden, um z. B. fremde oder eigene Proteine zu exprimieren, auch wenn sich die Klonierungen wesentlich schwieriger gestalten als mit einem Shuttle-Vektor (NORGREN et al. 1989; NATARAJAN UND ORIEL 1991). Das in *E. coli* replizierte Plasmid pAM120 enthält das gesamte Transposon Tn916 und besitzt eine singuläre *Bst*XI-Schnittstelle, in die das gewünschte DNA-Fragment ligiert werden könnte. Diese Schnittstelle befindet sich in einem Bereich des Transposons, der für den konjugativen Transfer nicht notwendig ist (NORGREN et al. 1989). Kann das Transposon nicht direkt von *E. coli* auf *E. acidaminophilum* übertragen werden, müsste das Plasmid zunächst in einen geeigneten Donorstamm übertragen werden. Sollen Gene exprimiert werden, muss das Fragment auch den Promotorbereich mit umfassen. Auch könnte ein Promotor vor das entsprechende Gen kloniert werden. Dabei sollten Promotoren von Genen von *E. acidaminophilum* berücksichtigt werden, die stark transkribiert werden und deren Promotorbereich bereits durch Primer Extension-Experimente bekannt ist. Neben dem *fdh-I*-Promotor, der in dieser Arbeit charakterisiert wurde, könnten auch die Promotoren des *prpU*-Gens oder der Betain-Reduktase Verwendung finden (LECHEL 1999; SONNTAG 1998). Letzterer hätte den Vorteil einer Induzierbarkeit durch Betain. Wäre das Gen des S-Layer-Proteins bekannt, könnte zur Überexpression von Proteinen auch der Promotor dieses Gens eingesetzt werden.

Auch könnten mit Hilfe dieser Methode Gene „ausgeknockt“ werden, indem in besagte Schnittstelle ein Teil des Zielgens kloniert wird. Ein kleiner Teil der nach erfolgreicher Konjugation erhaltenen Transposonmutanten enthält dann das Transposon in dem gewünschten Gen (NORGREN et al. 1989).

Parallel zu weiteren Konjugationsexperimenten sollten Versuche erfolgen, eine PEG-vermittelte Transformation von *E. acidaminophilum* zu erreichen. Es gibt Hinweise darauf, dass sich diese bereits in Vergessenheit geratene Methode insbesondere für Organismen mit S-Layer eignet. Sowohl *Bacillus brevis* 47 als auch *Clostridium thermohydrosulfuricum* konnten durch Anwendung dieser Methode mit Plasmid-DNA transformiert werden (TAKAHASHI et al. 1983; SOUTSCHEK-BAUER et al. 1985). Für beide Stämme wurden S-Layer beschrieben (YAMADA et al. 1981; MESSNER UND SLEYTR 1992). *B. brevis* 47 besitzt

sogar eine zwei-schichtige S-Layer, die entsprechenden Gene wurden kloniert und sequenziert (TSUBOI et al. 1986; YAMAGATA et al. 1987). Beide Stämme konnten mit brauchbaren Effizienzen transformiert werden. Diese Methode klingt daher sehr vielversprechend in Bezug auf eine erfolgreiche Transformation von *E. acidaminophilum*, konnte jedoch aus technischen Gründen nicht mehr getestet werden.

Es ist davon auszugehen, dass *E. acidaminophilum* in seiner natürlichen Umgebung durchaus zur Aufnahme von DNA befähigt ist, sei es durch Konjugation oder durch natürliche Kompetenz. Wie in 3.7.6 beschrieben, weicht die Codon-Nutzung in den Genen des Restriktions-Modifikations-Systems erheblich von der der anderen Gene aus *E. acidaminophilum* ab. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass diese Gene z. B. durch lateralen Gentransfer erworben wurden.

4.9 Ausblick

In einer weiteren Anreicherung aus auf Serin-gewachsenen Zellen sollten beide Formiat-Dehydrogenasen homogen isoliert werden, nachdem in Vorversuchen der Verbleib von FDH-I geklärt wurde. Durch die homogene Darstellung der FDH-I würde sich die Frage klären lassen, ob auch diese Formiat-Dehydrogenase mit der Hydrogenase assoziiert vorliegt oder ob den beiden Isoenzymen beim Wachstum auf Serin verschiedene Aufgaben zukommen. Bei der Anreicherung sollten auch weitere interessante Enzyme wie die katalytische Untereinheit HymC der Eisen-Hydrogenase, die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase und die Pyruvat-Formiat-Lyase verfolgt bzw. wenn möglich angereichert werden.

Durch biophysikalisch-chemische Untersuchungen wie EPR- und Mössbauerspektroskopie könnten die aufgrund von Sequenzmotiven postulierten Redoxzentren der Proteine nachgewiesen werden sowie Einblicke in den intramolekularen Elektronentransport erhalten werden. In diesem Zusammenhang wären auch Experimente sinnvoll, unter Erhalt der Aktivität bzw. ohne Zerstörung von Struktur oder der Cofaktoren, insbesondere der Eisen-Schwefel-Zentren, eine Trennung der einzelnen an dem Formiat-Dehydrogenase/Hydrogenase-Komplex beteiligten Proteinspezies zu erreichen, um dann die einzelnen Untereinheiten untersuchen zu können.

Nach vollständiger Sequenzierung der Gene der Pyruvat-Formiat-Lyase, sowie der Klonierung der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase ausgehend von dem bekannten N-Terminus oder mittels heterologer Hybridisierung, sollten Expressionsstudien unter Anwendung von z. B. semi-quantitativer RT-PCR klären, welchen Anteil diese beiden Enzyme beim Wachstum auf Serin an der Umsetzung des Pyruvats besitzen.

In *E. coli* exprimiertes Δ FdhA1 könnte zur Herstellung von Antikörpern verwendet werden, mit denen man die Lokalisation der Formiat-Dehydrogenase(n) in der Zelle beim Wachstum auf verschiedenen Medien untersuchen könnte.

Die bisher nur auf Genebene untersuchte Formiat-Dehydrogenase sowie die CAR/AOR aus *C. sticklandii* sollten zur näheren Charakterisierung angereichert werden. Dabei ist insbesondere von Interesse, ob es sich wie in *E. acidaminophilum* ebenfalls um Wolfram-abhängige Enzyme handelt. Die Anreicherung der CAR/AOR könnte auch klären, ob das Protein eher den AORs oder den CARs zuzuordnen ist.

Die für die Zukunft wichtigsten Experimente betreffen die Entwicklung eines Transformationssystems für *E. acidaminophilum*. Bereits jetzt wären viele Versuche denkbar, die eine Manipulierbarkeit des Organismus benötigen. So z. B. Untersuchungen zur Funktion unbekannter Gene, zur Regulation der Genexpression, zur näheren Charakterisierung von komplexen nicht in *E. coli* exprimierbaren Proteinen durch Mutationsstudien oder auch einfach nur zur Überexpression solcher Proteine.

5 Zusammenfassung

1. Die Strukturgenregionen von zwei verschiedenen Formiat-Dehydrogenasen wurden identifiziert. Beide Gensätze zeigen die Anordnung *fdhBA* und codieren eine Selenocystein-haltige Formiat-Dehydrogenase. Die katalytischen Untereinheiten FdhA1 und FdhA2 weisen 66,6 % Identität, die potentiell elektronentransferierenden Untereinheiten FdhB1 und FdhB2 50,8 % Identität auf. Die katalytischen Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenasen von *E. acidaminophilum* weisen eine N-terminale Extension in einer Länge von 220 Aminosäuren auf, für die ein [2Fe-2S]- und drei [4Fe-4S]-Zentren postuliert werden können. Die C-terminale Domäne (ab Aminosäure 220) bindet die beiden Molybdopterin-Cofaktoren, die das Wolfram komplexieren, sowie ein weiteres [4Fe-4S]-Zentrum. Die elektronentransferierenden Untereinheiten FdhB1 und FdhB2 weisen hohe Homologien zu den N-terminalen Regionen der katalytischen Untereinheiten auf, weswegen für sie ebenfalls ein [2Fe-2S]- und vier [4Fe-4S]-Zentren postuliert werden können.
2. Mittels Northern-Blot-Hybridisierungen wurde die Expression der beiden *fdh*-Operons untersucht. Die beiden Strukturgene der FDH-I *fdhA1* und *fdhB1* werden gemeinsam mit den stromabwärts gelegenen Genen *mog*, *mobA* und *fdhD* transkribiert. Der Transkriptionsstartpunkt wurde mittels *primer extension* bestimmt und befindet sich 343 bp stromaufwärts von *fdhB1*. Die Promotorregion weist keine Ähnlichkeit zu Konsensussequenzen bekannter Promotoren auf. Stromabwärts von *fdhD* können zwei potentielle Terminatorstrukturen postuliert werden.
Die Strukturgene des *fdh*-Gensatzes II werden in einer 5,4 kb-mRNA gemeinsam mit dem stromabwärts gelegenen *fdhC*-Gen transkribiert, das für einen Formiat-Carrier codiert.
3. Beide Gensätze werden konstitutiv exprimiert, jedoch Gensatz I auf 100-fach höherem Niveau im Vergleich zu Gensatz II beim Wachstum auf Glycin. Nach Induktion durch Serin (40 mM) wird die Expression des Gensatzes II der des Gensatzes I angeglichen.
4. Stromaufwärts des *fdh*-Gensatzes I wurde das *hym*-Operon identifiziert, das eine vermutlich Membran-assoziierte Eisen-Hydrogenase codiert. Es umfasst die vier Gene *hymABCD*, wobei *hymA* und *hymB* elektronentransferierende Untereinheiten und *hymC* die katalytische Untereinheit der Eisen-Hydrogenase codieren. Für das von *hymD* codierte Protein wurden sechs Membrandurchgänge postuliert. Die Eisen-Hydrogenase ist reich an Eisen-Schwefel-Zentren, für HymA kann ein [2Fe-2S]-, für HymB ein [2Fe-2S]- und drei [4Fe-4S]- sowie für HymC ein [2Fe-2S]- und drei [4Fe-4S]-Zentren postuliert werden. HymC enthält außerdem das [H]-Cluster, das weitere sechs Eisen-Atome aufweist.
5. Die FDH-II liegt beim Wachstum auf Serin- und Serin/Formiat assoziiert mit der vom *hym*-Operon codierten Hydrogenase vor. Aus Zellen, die in Serin/Formiat-Medium gewachsen waren, konnte die FDH-II im Komplex mit HymB homogen dargestellt werden. Sie besitzt eine molekulare Masse von

- 540.000 Da und weist eine apparente $(\alpha\beta\gamma)_2$ -Struktur auf, wobei α und β als katalytische bzw. elektronentransferierende Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenase FdhA2 und FdhB2 identifiziert wurden und γ als elektronentransferierende Untereinheit der Hym-Hydrogenase HymB. Mittels Neutronenaktivierung konnte im Enzym Wolfram, Selen, Eisen und Zink, sowie in geringen Mengen Cobalt und Chrom nachgewiesen werden. Der das Wolfram komplexierende Molybdopterin-Cofaktor wurde nachgewiesen. Das Enzym besitzt eine hohe spezifische Aktivität und kann neben der Formiat-Oxidation auch die CO_2 -Reduktion mit hohen Umsatzraten katalysieren.
6. Die katalytische Untereinheit der FDH-I, FdhA1, wurde heterolog in *E. coli* exprimiert, jedoch wurde das Selenocystein-codierende TGA-Codon als Stopcodon erkannt, so dass nur ein verkürztes Protein gebildet wurde. Die Cystein-Mutante, in der Selenocystein gegen Cystein ausgetauscht war, konnte in voller Länge exprimiert werden. Durch Unterschiede in der Codonnutzung zwischen *E. acidaminophilum* und *E. coli* wurden die Proteine nur bei Coexpression von in *E. coli* seltene tRNAs exprimiert. Trotz verschiedenster Variationen der Anzuchtbedingungen wurde das Protein stets in *inclusion bodies* exprimiert. Durch Deletion der N-terminalen Extension der katalytischen Untereinheit wurde ein geringer Teil des Proteins in der löslichen Fraktion gefunden, was darauf hindeutet, dass die Probleme durch den Cystein-reichen N-terminalen Teil des Proteins ausgelöst werden.
 7. Durch heterologe Hybridisierung konnte im Genom von *C. sticklandii* eine Formiat-Dehydrogenase identifiziert und sequenziert werden. Das *fdhA*-Gen, das für die katalytische Untereinheit der Formiat-Dehydrogenase codiert, weist ein *in-frame* TGA-Codon auf, so dass es sich ebenfalls um ein Selenocystein-haltiges Enzym handeln sollte. Die katalytische Untereinheit gehört zu der Gruppe der Formiat-Dehydrogenasen des kürzeren Typs, die nur ein [4Fe-4S]-Zentrum aufweisen. Stromabwärts des *fdhA*-Gens ist ein Gen lokalisiert, das für ein potentiell elektronentransferierendes Protein codiert, für das vier [4Fe-4S]-Zentren vom Ferredoxin-Typ postuliert werden können. Stromaufwärts des *fdhA*-Gens von *C. sticklandii* wurde auf dem komplementären Strang ein offener Leserahmen identifiziert, dessen abgeleitete Proteinsequenz signifikante Homologien zu der Wolfram-abhängigen Aldehyd-Oxidoreduktase (AOR) aus *P. furiosus* aufweist. Der N-Terminus zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu der ebenfalls Wolfram-abhängigen Carbonsäure-Reduktase (CAR) aus *C. formicoaceticum*, diese Enzyme katalysieren die Reduktion von Carbonsäuren zu Aldehyden mit höherer Effizienz im Vergleich zu den AORs. Die bisher vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass es sich bei dem von dem *car/aor*-Gen codierten Protein eher um eine CAR handelt. Die Transkription der Formiat-Dehydrogenase als auch der CAR/AOR wurde mittels RT-PCR nachgewiesen.
 8. Die zur Transformation von *E. acidaminophilum* durchgeführten Elektroporationsexperimente waren bisher erfolglos. Möglicherweise behindert die *surface layer* des Bakteriums eine Transformation durch Elektroporation, indem sie als eine Art Faraday-Käfig wirkt.

Auch die Übertragung des konjugativen Transposons Tn916 war bisher nicht erfolgreich. Als Donatoren wurden *E. coli* und *E. faecalis* verwendet.

9. Aus *E. acidaminophilum* wurde die Restriktionsendonuklease *EacI* isoliert und charakterisiert. Sie gehört zum Typ IIS, erkennt das asymmetrische Sequenzmotiv (5'-GGATC-3') und schneidet nach vier Basen im Oberstrang bzw. 5 Basen im Unterstrang. Das Methylase-Restriktase-Modifizierungssystem wurde kloniert und sequenziert. Beide Proteine wurden in *E. coli* exprimiert, die Aktivität der exprimierten Methylase konnte nachgewiesen werden.

Die beiden Gene weisen eine Codonnutzung auf, die sich von der in *E. acidaminophilum* üblichen deutlich unterscheidet, was auf den Erwerb des Methylase-Restriktase-Modifizierungssystems durch horizontalen Gentransfer hindeutet.

6 Literaturverzeichnis

- ADAMS, M.W.W., 1993. Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100°C. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 627-658
- AFSHAR, S., KIM, C., MONBOUQUETTE, H.G., SCHRÖDER, I., 1998. Effect of tungsten on nitrate reduction by the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3004-3008
- ALLEN, S.P., BLASCHEK, H.P., 1988. Electroporation-induced transformation of intact cells of *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2322-2324
- ALMENDRA, M.J., BRONDINO, C.D., GAVEL, O., PEREIRA, A.S., TAVARES, P., BURSAKOV, S., DUARTE, R., CALDEIRA, J., MOURA, J.J.G., MOURA, I., 1999. Purification and characterization of a tungsten-containing formate dehydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Biochemistry* 38: 16366-16372
- ANDRADE, S.L.A., BRONDINO, C.D., FEIO, M.J., MOURA, I., MOURA, J.J.G., 2000. Aldehyde oxidoreductase activity in *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491. EPR assignment of the proximal [2Fe-2S] cluster to the Mo site. *Eur. J. Biochem.* 267: 2054-2061
- ANDERSON, J.E., 1993. Restriction endonucleases and modification methylases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 24-30
- ANDREESEN, J.R., 1994a. Acetate via glycine: a different form of acetogenesis. In: *Acetogenesis*. Hrsg.: Drake, H.L., Chapman and Hall Inc., New York, 568-626
- ANDREESEN, J.R., 1994b. Glycine metabolism in anaerobes. *Ant. v. Leeuwenhoek* 66: 223-237
- ANDREESEN, J.R., EL GHAZZAWI, E., GOTTSCHALK, G., 1974. The effect of ferrous ions, tungstate and selenite on the level of formate dehydrogenase in *Clostridium formicoaceticum* and formate synthesis from CO₂ during pyruvate fermentation. *Arch. Microbiol.* 96: 103-118
- ANDREESEN, J.R., LJUNGDAHL, L.G., 1973. Formate dehydrogenase of *Clostridium thermoaceticum*: incorporation of selenium-75, and effects of selenite, molybdate and tungstate on the enzyme. *J. Bacteriol.* 116: 867-873
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. (Hrsg.), 1994. *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates Inc. and John Wiley and Sons Inc., New York
- AXLEY, M.J., BÖCK, A., STADTMAN, T.C., 1991. Catalytic properties of an *Escherichia coli* formate dehydrogenase mutant in which sulfur replaces selenium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8450-8454
- BAENA, S., FARDEAU, M.-L., WOO, T.H.S., OLLIVIER, B., LABAT, M., PATEL, B.K.C., 1999. Phylogenetic relationships of three amino-acid-utilizing anaerobes, *Selenomonas acidaminovorans*, „*Selenomonas acidaminophila*“ and *Eubacterium acidaminophilum*, as inferred from partial 16S rDNA nucleotide sequences and proposal of *Thermanaerovibrio acidaminovorans* gen. nov. comb. nov. and *Anaeromusa acidaminophila* gen. nov. comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 969-974
- BANNAM, T.L., ROOD, J.I., 1993. *Clostridium perfringens*-*Escherichia coli* shuttle vectors that carry single antibiotic resistance determinants. *Plasmid* 229: 233-235

- BARON, S.F., FERRY, J.G., 1989. Reconstitution and properties of a coenzyme F₄₂₀-mediated formate hydrogenlyase system in *Methanobacterium formicicum*. J. Bacteriol. 171: 2854-3859
- BECKHOFER, D., 1993. 5'-mRNA stabilizers. In: Control of messenger RNA stability. Hrsg.: Belasco, J., Brawerman, G., Academic Press Inc., San Diego, California, 31-52
- BENOIT, S., ABAIBOU, H., MANDRAND-BERTHELOT, M.-A., 1998. Topological analysis of the aerobic membrane-bound formate dehydrogenase of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 180: 6625-6634
- BERG, B.L., LI, J., HEIDER, J., STEWART, V., 1991. Nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. I. Nucleotide sequence of the *fdnGHI* operon and evidence that *opal* (UGA) encodes selenocysteine. J. Biol. Chem. 266: 22380-22385
- BERTRAM, J., GASSEN, H.G., 1991. Gentechnische Methoden. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, New York
- BERTRAM, J., STRÄTZ, M., DÜRRE, P., 1991. Natural transfer of conjugative transposon Tn916 between Gram-positive and Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 173: 443-448
- BEVERIDGE, T.J., GRAHAM, L.L., 1991. Surface layers of bacteria. Microbiol. Rev. 55: 684-705
- BLAKE, M.S., JOHNSTON, K.H., RUSSEL-JONES, G.J., GOTTSCHLICH, E.C., 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. Anal. Biochem. 136: 175-179
- BLANCHARD, J.S., CLELAND, W.W., 1980. Kinetic and chemical mechanisms of yeast formate dehydrogenase. Biochemistry 19: 3543-3550
- BLATTNER, F.R., PLUNKETT, G.III., BLOCH, C.A., PERNA, N.T., BURLAND, V., RILEY, M., COLLADO-VIDES, J., GLASNER, J.D., RODE, C.K., MAYHEW, G.F., GREGOR, J., DAVIS, N.W., KIRKPATRICK, H.A., GOEDEN, M.A., ROSE, D.J., MAU, B., SHAO, Y., 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli*. Science 277: 1453-1474
- BÖHRINGER, M., 1997. Vektor-Konstruktion, Untersuchung von Antibiotika-Resistenzen und Elektrottransformation von *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. Diplomarbeit, Universität Ulm
- BOKRANZ, M., GUTMANN, M., KÖRTNER, C., KOJRO, E., FAHRENHOLZ, F., LAUTERBACH, F., KRÖGER, A., 1991. Cloning and nucleotide sequence of the structural genes encoding the formate dehydrogenase of *Wolinella succinogenes*. Arch. Microbiol. 156: 119-128
- BÖMMER, D., 1995. Genetische Untersuchungen zur Formiatoxidation in *Alcaligenes eutrophus*: Charakterisierung des *cbbB_C*-Gens. Dissertation, Universität Göttingen
- BOORSTEIN, W.R., CRAIG, E.A., 1989. Primer extension analysis of RNA. Meth. Enzymol. 180: 247-369
- BOOT, H.J., POWWELS, P.H., 1996. Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. Mol. Microbiol. 21: 1117-1123
- BOYINGTON, J.C., GLADYSHEV, V.N., KHANGULOV, S.V., STADTMAN, T.C., SUN, P.D., 1997. Crystal structure of formate dehydrogenase H: catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine, and an Fe₄S₄ cluster. Science 275: 1305-1308

- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- BRINKMANN, U., 1990. Expression der cDNA von humanem Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tPA) in *Escherichia coli*. Dissertation, Universität Stuttgart
- BUC, J., SANTINI, C.-L., GIORDANI, R., CZIZEK, M., WU, L.-F., GIORDANO, G., 1999. Enzymatic and physiological properties of the tungsten-substituted molybdenum TMAO reductase from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 32: 159-168
- BURGDORF, T., 1998. Genetische Analyse der Formiatoxidation und der Molybdopterinbiosynthese in *Ralstonia eutropha*. Dissertation, Universität Göttingen
- BURSAKOV, S.A., CARNEIRO, C., ALMENDRA, M.J., DUARTE, R.O., CALDEIRA, J., MOURA, I., MOURA, J.J.G., 1997. Enzymatic properties and effect of ionic strength on periplasmic nitrate reductase (NAP) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239: 816-822
- CHABRIÈRE, E., CHARON, M.-H., VOLBEDA, A., PIEULLE, L., HATCHIKIAN, E.C., FONTECILLA-CAMPS, J.-C., 1999. Crystal structures of the key anaerobic enzyme pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, free and in complex with pyruvate. *Nat. Struct. Biol.* 6: 182-190
- CHAN, M.K., MUKUND, S., KLETZIN, A., ADAMS, M.W.W., REES, D.C., 1995. Structure of a hyperthermophilic tungstopterin enzyme, aldehyde ferredoxin oxidoreductase. *Science* 267: 1463-1469
- CHARON, M.H., VOLBEDA, A., CHABRIÈRE, E., PIEULLE, L., FONTECILLA-CAMPS, J.-C., 1999. Structure and electron transfer mechanism of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 663-669
- CLAAS, J.-U., 1991. Isolierung und Charakterisierung von Ferredoxin und Thioredoxin und deren Einbindung in den Elektronentransport von *Eubacterium acidaminophilum*. Diplomarbeit, Universität Göttingen
- COLAS DES FRANCS-SMALL, C., AMBARD-BRETTEVILLE, F., SMALL, I.D., RÉMY, R., 1993. Identification of a major soluble protein in mitochondria from nonphotosynthetic tissues as NAD-dependent formate dehydrogenase. *Plant Physiol.* 102: 1171-1177
- COLLINS, M.D., LAWSON, P.A., WILLEMS, A., CORDOBA, J.J., FERNANDEZ-GARAYZABAK, J., GARCIA, P., CAI, J., HIPPE, H., FARROW, J.A.E., 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: Proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 812-826
- COSTA, C., TEIXEIRA, M., LEGALL, J., MOURA, J.J.G., MOURA, I., 1997. Formate dehydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: isolation and spectroscopic characterization of the active sites (heme, iron-sulfur centers and molybdenum). *J. Biol. Inorg. Chem.* 2: 198-208
- D'AUBENTHON CARAFA, Y., BRODY, E., THERMES, C., 1990. Prediction of *rho*-independent *Escherichia coli* transcription terminators. *J. Mol. Biol.* 216: 835-858
- DEATON, J.C., SOLOMON, E.I., WATT, G.D., WETHERBEE, P.J., DURFOR, C.N., 1987. Electron Paramagnetic resonance studies of the tungsten-containing formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149: 424-430

- DECKERT, G., WARREN, P.V., GAASTERLAND, T., YOUNG, W.G., LENOX, A.L., GRAHAM, D.E., OVERBEEK, R., SNEAD, M.A., KELLER, M., AUJAY, M., HUBER, R., FELDMAN, R.A., SHORT, J.M., OLSEN, G.J., SWANSON, R.V., 1998. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392: 353-358
- DE LUCA, G., ASSO, M., BELAICH, J.P., DERMOUNT, Z., 1998. Purification and characterization of HndA subunit of NADP-reducing hydrogenase from *Desulfovibrio fructosovorans* overproduced in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37: 2660-2665
- DIAS, J.M., THAN, M.E., HUMM, A., HUBER, R., BOURENKOV, G.P., BARTUNIK, H.D., BURSAKOV, S., CALVETE, J., CALDEIRA, J., CARNEIRO, C., MOURA, J.J.G., MOURA, I., ROMÃO, M.J., 1999. Crystal structure of the first dissimilatory nitrate reductase at 1.9 Å solved by MAD methods. *Structure* 7: 65-79
- DIETRICH, D., MEYER, M., RIETH, M., ANDREESSEN, J.R., 1991. Interaction of selenoprotein P_A and the thioredoxin system, components of the NADPH-dependent reduction of glycine in *Eubacterium acidaminophilum* and *Clostridium litoralis*. *J. Bacteriol.* 173: 5983-5991
- DOUCET-POPULAIRE, F., TRIEU-CUOT, P., DOSBAA, I., ANDREMONT, A., COURVALIN, P., 1991. Inducible transfer of conjugative transposon Tn1545 from *Enterococcus faecalis* to *Listeria monocytogenes* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 185-187
- DUARTE, R.O., REIS, A.R., GÍRIO, F., MOURA, I., MOURA J.J.G., COLLAÇO, T.A., 1997. The formate dehydrogenase isolated from the aerobic *Methylobacterium* sp. RXM is a molybdenum-containing protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230: 30-34
- DÜRRE, P., 1993. Transposons in clostridia. In: *The Clostridia and biotechnology*. Hrsg.: Woods, D.R., Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA, 227-246
- ECKERSKORN, C., JUNGBLUT, P., MEWES, W., KLOSE, J., LOTTSPEICH, F., 1988. Identification of mouse brain proteins after two-dimensional electrophoresis and electroblotting by microsequence analysis and amino acid composition analysis. *Electrophoresis* 9: 830-838
- ENGELHARDT, H., PETERS, J., 1998. Structural research on surface layers: a focus on stability, surface layer homology domains, and surface layer-cell wall interactions. *J. Struct. Biol.* 124: 276-302
- ENGLER-BLUM, G., MEIER, M., FRANK, J., MÜLLER, G.A., 1993. Reduction of background problems in nonradioactive Northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Anal. Biochem.* 210: 235-244
- FENDRICH, C., HIPPE, H., GOTTSCHALK, G., 1990. *Clostridium halophilum* sp. nov. and *C. litorale* sp. nov., an obligate halophilic and a marine species degrading betaine in the Stickland reaction. *Arch. Microbiol.* 154: 127-132
- FRANKE, A.E., CLEWELL, D.B., 1981. Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of „conjugal“ transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J. Bacteriol.* 145: 494-502
- FREUDENBERG, W., HORMANN, K., RIETH, M., ANDREESSEN, J.R., 1989. Involvement of a selenoprotein in glycine, sarcosine, and betaine reduction by *Eubacterium acidaminophilum*. In: *Selenium in biology and medicine*. Hrsg.: Wendel, A., Springer-Verlag, Heidelberg, 25-28

- FRIEDEBOLD, J., MAYER, F., BILL, E., TRAUTWEIN, A.X., BOWIEN, B., 1995. Structural and immunological studies on the soluble formate dehydrogenase from *Alcaligenes eutrophus*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376: 561-568
- FRIEDEBOLD, J., 1994. Das Formiat-oxidierende Enzymsystem in *Alcaligenes eutrophus*: Biochemische Charakterisierung der löslichen Formiat-Dehydrogenase. Dissertation, Universität Göttingen
- FRIEDEBOLD, J., BOWIEN, B., 1993. Physiological and biochemical characterization of the soluble formate dehydrogenase, a molybdoenzyme from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 175: 4719-4728
- FRIEDRICH, C.G., BOWIEN, B., FRIEDRICH, B., 1979. Formate and oxalate metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Gen. Microbiol.* 115: 185-192
- FUCHS, G., 1986. CO₂ fixation in acetogenic bacteria: variations on a theme. *FEMS Microbiol. Rev.* 39: 181-213
- GALKIN, A., KULAKOVA, L., TISHKOV, V., ESAKI, N., SODA, K., 1995. Cloning of formate dehydrogenase gene from a methanol-utilizing bacterium *Mycobacterium vaccae* N10. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 479-483
- GARCIA, G.E., STADTMAN, T.C., 1992. *Clostridium sticklandii* glycine reductase selenoprotein A gene: cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174: 7080-7089
- GAWRON-BURKE, C., CLEWELL, D.B., 1984. Regeneration of insertially inactivated streptococcal DNA fragments after excision of transposon Tn916 in *Escherichia coli*: Strategy for targeting and cloning of genes from Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 159: 214-221
- GENTHNER, B.R.S., DAVIS, C.L., BRYANT, C.L., 1981. Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol and H₂/CO₂ utilizing species. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 12-19
- GILCHRIST, A., SMIT, J., 1991. Transformation of freshwater and marine caulobacters by electroporation. *J. Bacteriol.* 173: 921-925
- GÍRIO, F.M., MARCOS, J.C., AMARAL-COLLAÇO, M.T., 1992. Transition metal requirement to express high level NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from a serine-type methylotrophic bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 97: 161-166
- GRÄFE, U., 1992. Biochemie der Antibiotika. Struktur-Biosynthese-Wirkmechanismus. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York
- GRAENTZDOERFFER, A., PICH, A., ANDREESEN, J.R., 2000. Molecular analysis of the *grd*-operon coding for genes of the glycine reductase and thioredoxin system from *Clostridium sticklandii*. *Arch. Microbiol. in press*
- GRANDERATH, K., 1993. Charakterisierung der Formiat-Dehydrogenase und Aldehyd-Dehydrogenase als wolframhaltige Enzyme von *Eubacterium acidaminophilum*. Dissertation, Universität Göttingen
- GURSINSKY, T., JÄGER, J., ANDREESEN, J.R., SÖHLING, B., 2000. A *selDABC* cluster for selenocysteine incorporation in *Eubacterium acidaminophilum*. *Arch. Microbiol.* 174: 200-212
- HAMMEL, K.E., CORNWELL, K.L., BUCHANAN, B.B., 1983. Ferredoxin/flavoprotein-linked pathway for the reduction of thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50: 3681-3685

- HENSGENS, C.M.H., HAGEN, W.R., HANSEN, T.H., 1995. Purification and characterization of a benzyl viologen-linked, tungsten-containing aldehyde oxidoreduktase from *Desulfovibrio gigas*. J. Bacteriol. 177: 6195-6200
- HILLE, R., 1996. The mononuclear molybdenum enzymes. Chem. Rev. 96: 2757-2816
- HORMANN, K., ANDREESEN, J.R., 1989. Reductive cleavage of sarcosine and betaine by *Eubacterium acidaminophilum* via enzyme systems different from glycine reductase. Arch. Microbiol. 153: 50-59
- HUNGATE, R.E., 1969. A role tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Methods in Microbiology. Hrsg.: Norris, J.R., Ribbons, D.W., Band 3b, Academic Press, New York, London, 117-132
- HÜTTENHOFER, A., BÖCK, A., 1998. RNA structures involved in selenoprotein synthesis. In: RNA structure and function. Hrsg.: Simons, R.W., Grunberg-Manago, M., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 603-639
- JOHNSON, J.L., RAJAGOPALAN, K.V., 1982. Structural and metabolic relationship between the molybdenum cofactor and urothione. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6856-6860
- JOHNSON, M.K., REES, D., ADAMS, M.W.W., 1996. Tungstoenzymes. Chem. Rev. 96: 2817-2839
- JOLLIE, D.R., LIPSCOMB, J.D., 1991. Formate dehydrogenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. Purification and spectroscopic characterization of the cofactors. J. Biol. Chem. 266: 21853-21863
- JONES, J.B., STADTMAN, T.C., 1977. *Methanococcus vannielii*: culture and effects of selenium and tungsten on growth. J. Bacteriol. 130: 1404-1406.
- JUNGERMANN, K., THAUER, R.K., LEIMENSTOLL, G., DECKER, K., 1973. Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreduktase in saccharolytic clostridia. Biochem. Biophys. Acta 305: 268-280
- KABISCH, U.C., GRÄNTZDÖRFFER, A., SCHIERHORN, A., RÜCKNAGEL, K.P., ANDREESEN, J.R., PICH, A., 1999. Identification of D-proline reductase from *Clostridium sticklandii* as a selenoprotein and indications for a catalytically active pyruvoyl group derived from a cysteine residue by cleavage of a proprotein. J. Biol. Chem. 274: 8445-8454
- KAJI, M., TANIGUCHI, Y., MATSUSHITA, O., KATAYAMA, S., MIYATA, S., MORITA, S., OKABE, A., 1999. The *hydA* gene encoding the H₂-evolving hydrogenase of *Clostridium perfringens*: molecular characterization and expression of the gene. FEMS Microbiol. Lett. 181: 329-336
- KARDINAH, S., SCHMIDT, C.L., HANSEN, T., ANEMÜLLER, S., PETERSEN, A., SCHÄFER, G., 1999. The strict molybdate-dependence of glucose-degradation by the thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius* reveals the first crenarchaeotic molybdenum containing enzyme – an aldehyde reductase. Eur. J. Biochem. 260: 540-548
- KEIL, C., 1999. Klonierung und Charakterisierung einer Fe-Hydrogenase- und einer Acetatkinase-Genregion aus *Eubacterium acidaminophilum* sowie Versuche zum Nachweis der Ferredoxin-Thioferredoxin-Oxidoreduktase. Diplomarbeit, Universität Halle
- KENGEN, S.W.M., RIKKEN, G.B., HAGEN, W.R., VAN GINKEL, C.G., STAMS, A.J.M., 1999. Purification and characterization of (per)chlorate reductase from the chlorate-respiring strain GR-1. J. Bacteriol. 181: 6706-6711

- KHANGULOV, S.V., GLADYSHEV, V.N., DISMUKES, G.C., STADTMAN, T.C., 1998. Selenium-containing formate dehydrogenase H from *Escherichia coli*: a molybdopterin enzyme that catalyzes formate oxidation without oxygen transfer. *Biochemistry* 37: 3518-3528
- KHOSAKA, T., KIWAKI, M., 1984. *BinI*: a new site-specific endonuclease from *Bifidobacterium infantis*. *Gene* 31: 251-255
- KISKER, C., SCHINDELIN, H., BAAS, D., RÉTEY, J., MECKENSTOCK, R.U., KRONECK, P.M.H., 1999. A structural comparison of molybdenum cofactor-containing enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 503-521
- KISKER, C., SCHINDELIN, H., PACHECO, A., WEHBI, W.A., GARRETT, R.M., RAJAGOPALAN, K.V., ENEMARK, J.H., REES, D.C., 1997. Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell* 91: 973-983
- KLETZIN, A., 1997. Tungsten-containing aldehyde ferredoxin oxidoreductases. In: *Transition metals in microbial metabolism*. Hrsg.: Winkelmann, G., Carrano, C.J., Harwood Academic, Amsterdam. 357-390
- KLETZIN, A., ADAMS, M.W.W., 1996. Tungsten in biological systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 18: 5-63
- KLETZIN, A., MUKUND, S., KELLEY-CROUSE, T.L., CHAN, M.K., REES, D.C., ADAMS, M.W.W., 1995. Molecular characterization of the genes encoding the tungsten-containing aldehyde ferredoxin oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus* and formaldehyde ferredoxin oxidoreductase from *Thermococcus litoralis*. *J. Bacteriol.* 177: 4817-4819
- KLUG, S.J., HÜTTENHOFER, A., KROMAYER, M., FAMULOK, M., 1997. *In vitro* and *in vivo* characterization of novel mRNA motifs that bind special elongation factor SelB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6676-6681
- KNAPPE, J., SAWERS, G., 1990. A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 75: 383-398
- KRAFFT, T., BOWEN, A., THEIS, F., MACY, J.M., 2000. Cloning and sequencing of the genes encoding the periplasmic-cytochrome B-containing selenate reductase from *Thauera selenatis*. *DNA Seq.* 10: 365-377
- KRÖGER, A., 1975. The electron transport-coupled phosphorylation of the anaerobic bacterium *Vibrio succinogenes*. In: *Electron transfer chains and oxidative phosphorylation*. Hrsg.: Quagliariello, E., Papa, S., Palmieri, F., Slater, E.C., Siliprandi, N., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 265-270
- KUNST, F., OGASAWARA, N., MOSZER, I., ALBERTINI, A.M., ALLONI, G., AZEVEDO, V., BERTERO, M.G., et al., 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390: 249-256
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- LEBLANC, D.J., LEE, L.N., 1984. Physical and genetic analyses of the streptococcal plasmid pAM β 1 and cloning of its replication region. *J. Bacteriol.* 157: 445-453

- LECHEL, A., 1999. Klonierung, Sequenzierung und Analyse des 10 kDa Selenoprotein codierenden Gens *prpU* und seiner angrenzenden Genregion aus *Eubacterium acidaminophilum*. Diplomarbeit, Universität Halle
- LEE, S.Y., BENNETT, G.N., PAPOUTSAKIS, E.T., 1992. Construction of *Escherichia coli*-*Clostridium acetobutylicum* shuttle vectors and transformation of *Clostridium acetobutylicum* strains. *Biotechnol. Lett.* 14: 427-432
- LENGER, R., HERMANN, U., GROSS, R., SIMON, J., KRÖGER, A., 1997. Structure and function of a second gene cluster encoding the formate dehydrogenase of *Wolinella succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* 246: 646-651
- LEONHARDT, U., ANDREESEN, J.R., 1977. Some properties of formate dehydrogenase, accumulation and incorporation of ^{185}W -tungsten into proteins of *Clostridium formicoaceticum*. *Arch. Microbiol.* 115: 277-284
- LIN, W.-J., JOHNSON, E.A., 1991. Transposon Tn916 mutagenesis in *Clostridium botulinum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2946-2950
- LJUNGDAHL, L.G., ANDREESEN, J.R., 1978. Formate dehydrogenase: role of molybdenum, tungsten, and selenium. In: Molybdenum and molybdenum-containing enzymes. Hrsg.: Coughlan, G., Pergamon Press, Oxford, 465-486
- LJUNGDAHL, L.G., 1976. Tungsten, a biologically active metal. *Trends Biochem. Sci.* 1: 63-65
- LÜBBERS, M., ANDREESEN, J.R., 1993. Components of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Cloning, sequencing and identification of the genes for thioredoxin reductase, thioredoxin and selenoprotein P_A. *Eur. J. Biochem.* 217: 791-798
- MAIER, T., BINDER, U., BÖCK, A., 1996. Analysis of the *hydA* locus of *Escherichia coli*: two genes (*hydN* and *hypF*) involved in formate and hydrogen metabolism. *Arch. Microbiol.* 165: 333-341
- MAKDESSI, K., 2000. Identifizierung und Charakterisierung eines Wolframat-spezifischen ABC-Transporters und des Mop-Proteins aus *Eubacterium acidaminophilum*. Dissertation, Universität Halle
- MALKI, S., SAIMMAIME, I., DE LUCA, G., ROUSSET, M., DERMOUN, Z., BELAICH, J.P., 1995. Characterization of an operon encoding an NADP-reducing hydrogenase in *Desulfovibrio fructosovorans*. *J. Bacteriol.* 177: 2628-2636
- MECKENSTOCK, R.U., KRIEGER, R., ENSIGN, S., KRONECK, P.M.H., SCHINK, B., 1999. Acetylene hydratase of *Pelobacter acetylenicus*. Molecular and spectroscopic properties of the tungsten iron-sulfur enzyme. *Eur. J. Biochem.* 264: 176-182
- MENDEL, R.R., 1997. Molybdenum cofactor of higher plants: biosynthesis and molecular biology. *Planta* 203: 399-405
- MENON, A.L., HENDRIX, H., HUTCHINS, A., VERHAGEN, M.F., ADAMS, M.W., 1998. The delta-subunit of pyruvate ferredoxin oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus* is a redox-active, iron-sulfur protein: evidence for an ancestral relationship with 8Fe-type ferredoxins. *Biochemistry* 37: 12838-12846

- MERMELSTEIN, L.D., WELKER, N.E., BENNETT, G.N., PAPOUTSAKIS, E.T., 1992. Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Bio/Technology* 10, 190-195
- MESSNER, P., SLEYTR, U.B., 1992. Crystalline bacterial cell-surface layers. *Adv. Microb. Physiol.* 33: 213-275
- MEYER, J., GAGNON, J., 1991. Primary structure of hydrogenase I from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry* 30: 9697-9704
- MEYER, M., 1993. Beziehungen des Thioredoxin-Systems zur Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase in anaeroben, Aminosäure verwertenden Bakterien. Dissertation, Universität Göttingen
- MEYER, M., GRANDERATH, K., ANDREESEN, J.R., 1995. Purification and characterization of protein P_B of betaine reductase and its relationship to the corresponding proteins glycine reductase and sarcosine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. *Eur. J. Biochem.* 234: 184-191
- MESSNER, P., SLEYTR, U.B., 1988. Separation and purification of S-layers from Gram-positive and Gram-negative bacteria. In: *Bacterial cell surface techniques*. Hrsg.: Hancock, I.C., Poxton, I.R., Wiley and Sons, Chichester, Großbritannien, 97-104
- MUKUND, S., ADAMS, M.W.W., 1996. Molybdenum and vanadium do not replace tungsten in the catalytically active forms of the three tungstoenzymes in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* 178: 163-167
- MUKUND, S., ADAMS, M.W.W., 1995. Glyceraldehyde-3-phosphate ferredoxin oxidoreductase, a novel tungsten-containing enzyme with a potential glycolytic role in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* 270: 8389-8392
- MUKUND, S., ADAMS, M.W.W., 1993. Characterization of a novel tungsten-containing formaldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. A role for tungsten in peptide metabolism. *J. Biol. Chem.* 268: 13592-13600
- MUKUND, S., ADAMS, M.W.W., 1991. The novel tungsten-iron-sulfur protein of the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, is an aldehyde ferredoxin oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* 266: 14208-14216
- MUKUND, S., ADAMS, M.W.W., 1990. Characterization of a tungsten-iron-sulfur protein exhibiting novel spectroscopic and redox properties from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* 265: 11508-11516
- MULLANY, P., WILKS, M., PUCKEY, L., TABAQCHALI, S., 1994. Gene cloning in *Clostridium difficile* using Tn916 as a shuttle conjugative transposon. *Plasmid* 31: 320-323
- MÜLLER, U., WILLNOW, P., RUSCHIG, U., HÖPNER, T., 1978. Formate dehydrogenase from *Pseudomonas oxalaticus*. *Eur. J. Biochem.* 83: 485-498
- NAKOTTE, S., SCHAFFER, S., BÖHRINGER, M., DÜRRE, P., 1998. Electroporation of, plasmid isolation from and plasmid conservation in *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 564-567
- NATARAJAN, M.R., ORIEL, P., 1991. Conjugal transfer of recombinant transposon Tn916 from *Escherichia coli* to *Bacillus stearothermophilus*. *Plasmid* 26: 67-73

- NELSON, K.E., CLAYTON, R.A., GILL, S.R., GWINN, M.L., DODSON, R.J., HAFT, D.H., HICKEY, E.K., PETERSON, J.D., NELSON, W.C., KETCHUM, K.A., McDONALD, L., UTTERBACK, T.R., MALEK, J.A., LINHER, K.D., GARRETT, M.M., STEWART, A.M., COTTON, M.D., PRATT, M.S., PHILLIPS, C.A., RICHARDSON, D., HEIDELBERG, J., SUTTON, G.G., FLEISCHMANN, R.D., WHITE, O., SALZBERG, S.L., SMITH, H.O., VENTER, J.C., FRASER, C.M., 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399: 323-329
- NÖLLING, J., REEVE, J.N., 1997. Growth- and substrate-dependent transcription of the formate dehydrogenase (*fdhCAB*) operon in *Methanobacterium thermoformicum* Z-245. *J. Bacteriol.* 179: 899-908
- NORGREN, M., CAPARON, M.G., SCOTT, J.R., 1989. A method for allelic replacement that uses the conjugative transposon Tn916: deletion of the *emm6.1* allele in *Streptococcus pyogenes* JRS4. *Infect. Immun.* 57: 3846-3850
- OH, J.-I., BOWIEN, B., 1999. Dual control by regulatory gene *fdsR* of the *fds* operon encoding the NAD⁺-linked formate dehydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *Mol. Microbiol.* 34: 365-376
- OH, J.-I., BOWIEN, B., 1998. Structural analysis of the *fds* operon encoding the NAD⁺-linked formate dehydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *J. Biol. Chem.* 273: 26349-26360
- OULTRAM, J.D., LOUGHLIN, M., SWINFIELD, T.-J., BREHM, J.K., THOMPSON, D.E., MINTON, N.P., 1988. Introduction of plasmids into whole cells of *Clostridium acetobutylicum* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* 56, 83-88
- PARKHILL, J., WREN, B.W., MUNGALL, K., KETLEY, J.M., CHURCHER, C., BASHAM, D., CHILLINGWORTH, T., DAVIES, R.M., FELTWELL, T., HOLROYD, S., JAGELS, K., KARLYSHEV, A., MOULE, S., PALLEN, M.J., PENN, C.W., QUAIL, M., RAJANDREAM, M.A., RUTHERFORD, K.M., VANVLIET, A., WHITEHEAD, S., BARRELL, B.G., 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403: 665-668
- PARTHER, T., 1998. Charakterisierung einer selenhaltigen Peroxidase des strikt anaeroben Bakteriums *Eubacterium acidaminophilum*. Diplomarbeit, Universität Halle
- PETERS, J.W., LANZILOTTA, W.N., LEMON, B.J., SEEFELDT, L.C., 1998. X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science* 282: 1853-1858
- PIEULLE, L., MAGRO, V., HATCHIKIAN, E.C., 1997. Isolation and analysis of the gene encoding the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase of *Desulfovibrio africanus*, production of the recombinant enzyme in *Escherichia coli*, and effect of carboxy-terminal deletions on its stability. *J. Bacteriol.* 179: 5684-5692
- PLATT, T., 1986. Transcription termination and regulation of gene expression. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 339-372
- PLUNKETT, G. III., BURLAND, V., DANIELS, D.L., BLATTNER, F.R., 1993. Analysis of the *Escherichia coli* genome. III. DNA sequence of the region from 87.2 to 89.2 minutes. *Nucl. Acids Res.* 21: 3391-3398
- RABINOWITZ, J., 1972. Preparation and properties of clostridial ferredoxins. *Meth. Enzymol.* 24: 421-446

- RAUH, D. 2000. Isolierung, Charakterisierung und molekulare Analyse der wolframhaltigen Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Eubacterium acidaminophilum*. Diplomarbeit, Universität Halle
- REBELO, J., MACIEIRA, S., DIAZ, J.M., HUBER, R., ASCENSO, C.S., RUSNAK., F., MOURA, J.J.G., MOURA, I., ROMÃO, M.J. 2000. Gene sequence and crystal structure of the aldehyde oxidoreductase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *J. Mol. Biol.* 297: 135-146
- RECH, S., WOLIN, C., GUNSALUS, R.P., 1996. Properties of the periplasmic ModA molybdate-binding protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 271: 2557-2562
- REIZER, J., HOISCHEN, C., TITGEMEYER, F., RIVOLTA, C., RABUS, R., STÜLKE, J., KARAMATA, D., SAIER, M.H. JR, HILLEN, W., 1998. A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol. Microbiol.* 27: 1157-1169
- RIES, W., HOTZY, C., SCHOCHER, I., SLEYTR, U.B., SÁRA, M., 1997. Evidence that a secondary cell wall polymer recognizes the N-terminal part of the S-layer protein from *Bacillus stearothermophilus* PV72/p2. *J. Bacteriol.* 179: 3892-3898
- ROMÃO, M.J., KNÄBLEIN, J., HUBER, R., MOURA, J.J.G., 1997. Structure and function of molybdopterin containing enzymes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 68: 121-144
- ROSNER, B., SCHINK, B., 1995. Purification and characterization of acetylene hydratase of *Pelobacter acetylenicus*, a tungsten iron-sulfur protein. *J. Bacteriol.* 177: 5767-5772
- SAITO, H., MIURA, K.I., 1963. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 72: 619-620
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York
- SANGER, F., NICKLER, S., COULSEN, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- SANTANGELO, J.D., DÜRRE, P., WOODS, D.R., 1995. Characterization and expression of the hydrogenase-encoding gene from *Clostridium acetobutylicum* P262. *Microbiology* 141: 171-180
- SÁRA, M., SLEYTR, U.B., 2000. S-layer proteins. *J. Bacteriol.* 182: 859-868
- SAWERS, G., 1999. Biochemistry, physiology and molecular biology of glycol radical enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 543-551
- SAWERS, G., 1994. The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Ant. v. Leeuwenhoek* 66: 57-88
- SCHAUER, N.L., FERRY, J.G., 1986. Composition of the coenzyme F₄₂₀-dependent formate dehydrogenase from *Methanobacterium formicicum*. *J. Bacteriol.* 165: 405-411
- SCHINK, B., 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 262-280
- SCHLEIF, R., 1980. Assaying of organisms for the presence of restriction endonucleases. *Meth. Enzymol.* 65: 19-23

- SCHMITZ, R.A., ALBACHT, S.P.J., THAUER, R.K., 1992. A molybdenum and a tungsten isoenzyme of formylmethanofuran dehydrogenase in the thermophilic archaeon *Methanobacterium wolfei*. Eur. J. Biochem. 209: 1013-1018
- SCHNAPPINGER, D., HILLEN, W., 1996. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. Arch. Microbiol. 165: 359-369
- SCHNEEBERGER, A., FRINGS, J., SCHINK, B., 1999. Net synthesis of acetate from CO₂ by *Eubacterium acidaminophilum* through the glycine reductase pathway. FEMS Microbiol. Lett. 177: 1-6
- SCHUSTER, B., PUM, D., SLEYTR, U.B., 1998. Voltage clamp studies on S-layer supported tetraether lipid membranes. Biochim. Biophys. Acta 1369: 51-60
- SEBBAN, C., BLANCHARD, L., BRUSCHI, M., GUERLESQUIN, F., 1995. Purification and characterization of the formate dehydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. FEMS Microbiol. Lett. 133: 143-149
- SHINE, J., DALGARNO, L., 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementary to nonsense triplets and ribosome-binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1342-1346
- SHUBER, A.P., ORR, E.C., RECNY, M.A., SCHENDEL, P.F., MAY, H.D., SCHAUER, N.L., FERRY, J.G., 1986. Cloning, expression, and nucleotide sequence of the formate dehydrogenase genes from *Methanobacterium formicicum*. J. Biol. Chem. 261: 12942-12947
- SIMON, R., PRIEFER, U., PÜHLER, A., 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Bio/Technology 1: 784-791
- SLEYTR, U.B., BEVERIDGE, T.J., 1999. Bacterial S-layers. Trends Microbiol. 7: 253-260
- SLEYTR, U.B., MESSNER, P., 1988. Crystalline surface layers in procaryotes. J. Bacteriol. 170: 2891-2897
- SLOAN, J., WARNER, T.A., SCOTT, P.T., BANNAM, T.L., BERRYMAN, D.I., ROOD, J.I., 1992. Construction of a sequenced *Clostridium perfringens*-*Escherichia coli* shuttle plasmid. Plasmid 27: 207-219
- SONNTAG, D., 1998. Selenoprotein-codierende Gene in *Eubacterium acidaminophilum*: Organisation und Transkription der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase-spezifischen Gensätze. Dissertation, Universität Halle
- SOUTSCHEK-BAUER, E., HARTL, L., STAUDENBAUER, W.L., 1985. Transformation of *Clostridium thermohydrosulfuricum* DSM 568 with plasmid DNA. Biotechnol. Lett. 7: 705-710
- STADTMAN, T.C., MCCLUNG, L.S., 1957. *Clostridium sticklandii* nov. spec. J. Bacteriol. 73: 218-219
- STEWART, L.J., BAILEY, S., BENNETT, B., CHARNOCK, J.M., GARNER, C.D., MCALPINE, A.S., 2000. Dimethylsulfoxide reductase: an enzyme capable of catalysis with either molybdenum or tungsten at the active site. J. Mol. Biol. 299: 593-600
- STEWART, V., LIN, J.T., BERG, B.L., 1991. Genetic evidence that genes *fdhD* and *fdhE* do not control synthesis of formate dehydrogenase-N in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 173: 4417-4423
- STICHT, H., ROSCH, P., 1998. The structure of iron-sulfur proteins. Prog. Biophys. Mol. Biol. 70: 95-136

- STRÄTZ, M., 1991. Nachweis eines natürlichen DNA-Transfers zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Mikroorganismen und Etablierung eines DNA-Transfer-Systems für *Acetobacterium woodii*. Dissertation, Universität Göttingen
- SUPPMANN, B., SAWERS, G., 1994. Isolation and characterization of hypophosphite-resistant mutants of *Escherichia coli*: identification of the FocA protein, encoded by the *pfl* operon, as a putative formate transporter. *Mol. Microbiol.* 11: 965-982
- SWINFIELD, T.-J., OULTRAM, J.D., THOMPSON, D.E., BREHM, J.K., MINTON, N.P., 1990. Physical characterization of the replication region of the *Streptococcus faecalis* plasmid pAM β 1. *Gene* 87: 79-90
- TAKAHASHI, W., YAMAGATA, H., YAMAGUCHI, K., TSUKAGOSHI, N., UDAKA, S., 1983. Genetic transformation of *Bacillus brevis* 47, a protein-secreting bacterium, by plasmid DNA. *J. Bacteriol.* 156: 1130-1134
- THAUER, R.K., FUCHS, G., JUNGERMANN, K., 1973. CO₂ reductase from *Clostridium pasteurianum*: molybdenum dependence of synthesis and inactivation by cyanide. *FEBS Lett.* 38: 45-48
- THAUER, R.K., JUNGERMANN, K., DECKER, K., 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41: 100-180
- THAUER, R.K., KÄUFER, B., FUCHS, G., 1975. The active species of "CO₂" utilized by reduced ferredoxin:CO₂ oxidoreductase from *Clostridium pasteurianum*. *Eur. J. Biochem.* 55: 111-117
- THAUER, R.K., KIRSCHNIAWY, F.H., JUNGERMANN, K.A., 1972. Properties and function of the pyruvate formate-lyase reaction in clostridia. *Eur. J. Biochem.* 27: 282-290
- THAUER, R.K., RUPPRECHT, E., JUNGERMANN, K., 1970. The synthesis of one-carbon units from CO₂ via a new ferredoxin dependent monocarboxylic acid cycle. *FEBS Lett.* 8: 304-307
- TRIEU-CUOT, P., ARTHUR, M., COURVALIN, P., 1987. Transfer of genetic information between Gram-positive and Gram-negative bacteria under natural conditions. In: *Streptococcal Genetics*. Hrsg.: Ferretti, J.J., Curtis, C., American Society of Microbiology, Washington DC, USA, 65-68
- TSUBOI, A., UCHIHI, R., TABATA, R., TAKAHASHI, Y., HASHIBA, H., SASAKI, T., YAMAGATA, H., TSUKAGOSHI, N., UDAKA, S., 1986. Characterization of the genes coding for two major cell wall proteins from protein-producing *Bacillus brevis* 47: complete nucleotide sequence of the outer wall protein gene. *J. Bacteriol.* 168: 365-373
- TURNER, D.C., STADTMAN, T.C., 1973. Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* 154: 366-381
- UHDE, A., 1990. Wachstumsphysiologische Untersuchungen zum Abbau von Aminosäuren und mögliche Funktion eines elektronentransferierenden Flavoproteins bei *Clostridium sticklandii*. Diplomarbeit, Universität Göttingen
- VAN DER PLOEG, J.R., CUMMINGS, N.J., LEISINGER, T., CONNERTON, I.F., 1998. *Bacillus subtilis* genes for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates. *Microbiology* 144: 2555-2561
- VERHAGEN, M.F.J.M., O'ROURKE, T., ADAMS, M.W.W., 1999. The hyperthermophilic bacterium, *Thermotoga maritima*, contains an unusually complex iron-hydrogenase: amino acid sequence analyses versus biochemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1412: 212-229

- VORHOLT, J.A., VAUPEL, M., THAUER, R.K., 1997. A selenium-dependent and a selenium-independent formylmethanofuran dehydrogenase and their transcriptional regulation in the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*. *Mol. Microbiol.* 23: 1033-1042
- VORHOLT, J.A., THAUER, R.K., 1997. The active species of "CO₂" utilized by formylmethanofuran dehydrogenase from methanogenic Archaea. *Eur. J. Biochem.* 248: 919-924
- WAGNER, R., ANDREESEN, J.R., 1977. Differentiation between *Clostridium acidurici* and *Clostridium cylindrosporum* on the basis of specific metal requirements for formate dehydrogenase formation. *Arch. Microbiol.* 114: 219-224
- WAGNER, M., 1997. Untersuchungen zu Proteinkomponenten der substratspezifischen Untereinheiten der Glycin-, Sarkosin- und Betain-Reduktase aus *Eubacterium acidaminophilum*. Dissertation, Universität Halle.
- WAGNER, M., SONNTAG, D., GRIMM, R., PICH, A., ECKERSKORN, C., SÖHLING, B., ANDREESEN, J.R., 1999. Substrate-specific selenoprotein B of glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. Biochemical and molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 260: 38-49
- WEBER, K., OSBORN, M., 1969. The reliability of the molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412
- WEIDNER G., SAWERS, G., 1996. Molecular characterization of the genes encoding pyruvate formate-lyase and its activating enzyme of *Clostridium pasteurianum*. *J. Bacteriol.* 178: 2440-2444
- WHITE, H., STROBL, G., FEICHT, R., SIMON, H., 1989. Carboxylic acid reductase: a new tungsten enzyme catalyses the reduction of non-activated carboxylic acids to aldehydes. *Eur. J. Biochem* 184: 89-96
- WHITE, H., FEICHT, R., HUBER, C., LOTTSPEICH, F., SIMON, H., 1991. Purification and some properties of the tungsten-containing carboxylic acid reductase from *Clostridium formicoaceticum*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 372: 999-1005
- WHITE, W.B., FERRY, J.G., 1992. Identification of formate dehydrogenase-specific mRNA species and nucleotide sequence of the *fdhC* gene of *Methanobacterium formicum*. *J. Bacteriol.* 174: 4997-5004
- WÖSTEN, M.M.S.M., 1998. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 127-150
- YAMADA, H., TSUKAGOSHI, N., UDAKA, S., 1981. Morphological alterations of cell wall concomitant with protein release in a protein-producing bacterium, *Bacillus brevis* 47. *J. Bacteriol.* 148: 322-332
- YAMAGATA, H., ADACHI, T., TSUBOI, A., TAKAO, M., SASAKI, T., TSUKAGOSHI, N., UDAKA, S., 1987. Cloning and characterization of the 5' region of the cell wall protein gene operon in *Bacillus brevis* 47. *J. Bacteriol.* 169: 1239-1245
- YAMAMOTO, I., SAIKI, T., LIU, S.-M., LJUNGDAHL, L.G., 1983. Purification and properties of NADP-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*, a tungsten-selenium-iron protein. *J. Biol. Chem.* 258: 1826-1832
- YOUNG, M., MINTON, N.P., STAUDENBAUER, W.L., 1989. Recent advances in the genetics of the clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.* 63: 301-326

-
- ZINDEL, U., FREUDENBERG, W., RIETH, M., ANDREESEN, J.R., SCHNELL, J., WIDDEL, F., 1988. *Eubacterium acidaminophilum* sp. nov., a versatile amino acid-degrading anaerobe producing or utilizing H₂ or formate. Arch. Microbiol. 150: 254-266
- ZINONI, F., BIRKMANN, A., STADTMAN, T.C., BÖCK, A., 1986. Nucleotide sequence and expression of the polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4650-4654
- ZINONI, F., BIRKMANN, A., LEINFELDER, W., BÖCK, A., 1987. Cotranslational insertion of selenocysteine into formate dehydrogenase from *Escherichia coli* directed by an UGA codon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3156-3160

orf1
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
GAATTCAAAAAGAACCCAGAGTATCCATAGTTTTTCAAGAACCAGGCTGATGCCATGGCTCTCAGTAAGAAAAACATAGAATTCCCAATAAGGGGAGAGATGTAAAACGGAGTC
N S K K N P R V S I V F Q E P R L M P W L S V R K N I E F P I K G E I C K S E S
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
TGAAAAAGAGTCAAAGGAGCTGGACATGCTGGGGATAAAAAGCTTTTAAAAATGCTTATCCAGCCAGATTTCCGGAGGTATGGCACAAGAGTATCCCTGGGGGACTCTTTGCTA
E K R V E R Q L D M L G I K A F E N A F Y P S Q I S G G M A Q R V S L G R T L C Y
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
TGAGCCGACATAACTAATGGACGAGCCTTTGGGGCCCTTGATGCATTCACAGAAAAAGCTGCAGGATGAGATTGTGAAAAATTTCAAAATGAGAAAAAACATACTGTTTGT
E P D I I L M D E P L G A L D A F N R K K L Q D E I V K I F Q N E K K T I L F V
370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
AACTCATGATGTGGAGGAAGCTCTGCTCGGACAGAAGGTCTGTAATGGAAGGGGAGGATAAAAAGAAAGCATAAATGTAATATGGTTATCCAGAAACCCATCGTCAAATGA
T H D V E E A L L L G Q K V L V M E E G R I K E S I N V N M G Y P R N P S S N E

orf2
490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
GATGATTAATCTCAAGAAAGATACTCTCTCTATATTCGAGTAAAAAGGAGTGGTATGATGGATAACAGAAATAGCGCTAATCGCAATAAATAATGAAGACAGAAAGTGTGCAAAA
M I N L K K R I L S L I F E * M D N R I G V I A I I E D K E S V Q K
610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720
GGCCAAATGCCGTAAATGAGCGAATATTCGGATATGATAGTAGGAAGAATGGGGATACCCCTATAAGGAGAAAAATGTAAGTGTATATCAATAATAGTTGATGGAAATACAGATGAGATAGG
A N A V M S E Y S D M I V G R M G I P Y K E K N V S V I S I I V D G N T D E I G

orf3
730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840
TGCCTTGTGGGAAAACCTGGGAAATATTCCTGGGGTATGGTAAAAAGCGCGCTTACTAAAAAATAAAATGGATTAATCAATTAAGCTGCAAAATAAATTTTCGTTGGAGGAGATGTTT
A L S G K L G N I P G V M V K S A L T K K * M F
850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960
ATGAAAAGGATTAATACTCCCGCAGCAATGCTGCTGTGTAATGCTTTTTCGGGATGCGCACCAGGATCGCAACTTCGACTGAAACGGCAATATAGAGAAAATAAATA
M K R I K T A A A M L L S V M L V F S G C A P K D A G T S T E T G N I E K I N I
970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
TCTTATGTGAAACTGCCCTTAACATGCTCTATAGTTGAGAAGGAAAAAACATGTTTGGAGGAGAAATTTGGGAAAGACGGCATAAGAAGTACATCCCGGAAATAACTGAAGGCTCA
S Y V K L P L N M P S I V E K E K N M F E E E F G K D G I E V T F P E I T E G S
1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
AAGATGACACAGGCTGTGAGCAGGCTCTCTGATTTTTGCAATGCCCTGGGAGTACGTCGGCAATACTTCGGCTGCAACCGGAGTGGATATAAGATAAATCGGCATACACAGG
K M T Q A V A A G S L D F C N A L G G T S A I L A A A N G V D I K I I G I Y S R
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320
GCGCAAGGCTTCACTGTAATGACAAGAGCAGGACATAAATGGACTGGCTGACCTTAAAGGCAAAAGGTTGCGAGACCTAAGGGGCAATACTGCATCAGCTTTTAAATAGCCGGA
A P K A F T V M T R S Q D I N G L A D L K G K K V A G P K G T I L H Q L L I A G
1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
TTAAGTGAACAGGATGTCGGTGGATGACGTGGAATTCATAAATCGGAATACCAGAGCGGTTGACAGCATGAACAGCGGCAATGTGGATGTGCACITTTGTCCGGGCTCGGGT
L S E A G M S V D D V E F I N M G I P E A V A A M N S G N V D V A L V A G P A V
1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560
ACAAAGCAGTTTCGGACGGAGCCAAGTGATAACTACGGGAGAGGCTTTTATAGTCTACGATAGTAATAGCCCAAGCGGCAAAATTCATCAAAGAGCATCCCGACATGACAGCGAGA
T K A V S D G A K V I T T G E G L L D A T I V I A T S G K F I K E H P D M T A R
1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
TATATGGCTTCCACTCAAGAGCCTTGATTTTCATGAAGGACAATAGGGAAGAGACTGGAATGGGAGCAAAAGAAACCGGAATATCAAAAGAAAGATGTAGAAAAAATGTACACTGG
Y M A V H S R S L D F M K D N R E E T M E M A A K E T G I S K E D V E K M Y D W
1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
TATGACTTAACTCCTAGCATAACTCAAAGGATGTTGAAGAATGAAAAGACACAGGAGTTCTGCTTAAAAACGGCATGCTCGAGAGGGAATAGACATAAGTAGCATAATAGACAAT
Y D F N P S I T Q K D V E E L E K T Q E F L L K N G M L E K G I D I S S I I D N
1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920
AGTTTCGTTTCAAAATAGAACTAAAACAATAACAATAAATTAATCCCGGACACAAACAGTGCCTGGGCAATTTTGGTATAATCATGATATAAATCAAGATACATTGCAAGGTCGCT
S F V S K * ----->> <<-----

uvrC
1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040
CATGTTTCGATATCAAAAAGCAGCTTCAATGCTTCCGACTCTCCGGAGTATACATCATGAAGGATCAACGGGGACATCATATATATAGGCAAGGCGCAAGTCTCAAAAAACAGAGT
M F D I K K Q L S M L P D S P G V Y I M K D S T G D I I Y I G K A K S L K N R V
2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160
GAGGCAATTTTCGCTCACACGGAAGAGCAGCCCAAGGTCGAGGCAATGTTGGGCAACATAAGCCAGTTCGAGTATATAATGACTGACTCCGAGCTAGAGCTCTGATACCGAGTG
R Q Y F G S H G K S S P K V E A M V G N I S E F E Y I M T D S E L E A L I L E C
2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280
CAACCTAACAAGAAGCAGGCAAAATCAACATAATATCCGCGACGACAAGCATAACCCCTTCAAAAGGTCGAGCTCAATGAGGATTAATCAAGGGTGTCAAGGTCAGAAGCAT
N L I K K H R P K Y N I I F R D D K T Y P F I K V S V N E D Y P R V L K V R S M
2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
GAGGAGGACGAGCAAGATTTTCGGCCGTATACAAGCGAAGGAGCGGTCAACGCTCAATAAGGCTCATAAGGAGGATTTATCCATAAGGAAAGTCAAGAAACGACATAAAGCGCAT
R E D G A K Y F G P Y T S E G A V N D V I S L I R R I Y P I R K C K N D I K R M
2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520
GATCCAGCGAGGGAGCGCCATGCACTCACTATGACATAGGCAAGTGCACAGGCGCTCGAGGGGAATCGACGCAAGAGAGCAGTACATGACAGATGATAGACGAGATAGTCACTTTCT
I Q R G E R P C I N Y D I G K C T G P C R G I D A R E Q Y M Q M I D E I V T F L
2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640
CTCGGGAAGGAGCGAGCGCTCATAGAAATCCATAGAGCAGCAAAATGCAGGTAGCTCGGAGAGGCTCGACTTTGAAAAGGCAAGTATTTTCGTGACAAGATCGGCAGCCTCAGGATACT
S G R S E T L I E S I E Q M Q V A A E R L D F E K A A Y F R D K I G S L R I L
2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760
CGCCAGAGCAGAGATAGTCTCGAAAAGCTCGGTGAGCAGGATTTTCATCGCAGCTTATTTCTATGAAGGCAAGGCGTGCATACAGGATTTTTTTGTGAGGAAAGGAGGATAATAGG
A Q R Q K I V S K S V D Q D F I A A Y F Y E G K A C I Q V F F V R E G R I I G
2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880
CAGGAGCACTCGTTGTGGAGGATGTGCTTGAAGAACAAAAGGTGAGGTGTTCCGCTCCTCATAAAGCAATTTACTCGTATCAGGATTCATCCAGTGAAGTACTCATAGAGAG
R E H F V V E D V L E E Q K G E V F A S F I K H F Y S Y Q G F I P S E I L I E S
2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
CGAAACAGGGGAGGATGAAGTTCTCAAAGCTGGCTCGAGAGCATAAAAAGGCGTAAGTCCATATAAAGTCCCTCAAAGGGGAGAGCGTGAATGATTGAAATGGTGAAGAAAA
E T G E D E V L Q S W L E S I K G R K V H I K V P Q K G E K R E M I E M V K K N
3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120
TGCCAGAGGCTCGGCGAAAATTTTCTAATGTGAGCAGGCTCAAAGATTCACAGGAGCTGCTGAGGAACTCAGAAGTTTGTCTGAGCTTGAAGAACTCCAAAACAGGATAGAAAGCCTT
A R E S A E K F S N V S R L K D S Q E L L E E L R S L L E L E E T P N R I E A F

6370 6380 6390 6400 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480
ACGCTGACGAAAGTACCCTGGAGCATTTCATGGACAGATCAGTGCCTTGAAGGAGACCCTCACGCTGTAATAGAGGCCATGATGATAACTGGTTACGCCATAGGAGTAAACACGGATATA
A D E G D P G A F M D R S V L E G D P H A V I E A M M I T G Y A I G A N H G Y I

6490 6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600
TATATATAAGAGCCGAGTATCCTGTTGCTATAAAGAGACTTGAGATAGCATTGGCCACAGGCAAGAGAGTCCAGGATACCTTGGCAGAATGTAATGGGAACAGATTTTGAATTTGACATCG
Y I R A E Y P V A I K R L E I A L A Q A R E S G Y L G K N V M G T D F E F D I E

6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720
AGCTGAAACTCGGAGCCGAGCTTTGATGCGGTGAGGAGACTGCTCTTATCAACTCTATAGAAGGAAAACGTGGAATGGCAAATCCAAAGCCACCGTTCCCGGCAACGAAGCGGTAT
L K L G A G A F V C G E E T A L I N S I E G K R G M A N P K P P F P A N E G V W

6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800 6810 6820 6830 6840
GGAAAAACCTACAATAAACAACGTTAGAGACGCTTCCAAACGTTCCAAAGATAACTTAAAGAGCAGACTGGTTGCTTCAATAGGAACTGAAAATCTAAGGGAAGTAAAGGTTT
K K P T I I N N V E T L A N V P K I I L K G A D W F A S I G T E K S K G T K V F

6850 6860 6870 6880 6890 6900 6910 6920 6930 6940 6950 6960
TCGCTCTGGCGGAAGATAAACAACGTTGACTAGTTGAGGTTCCAATGGGAACCTACACTAAGAGAGATAATATATGAAGTAGGCGGAGGAATCCAAACGGCAAGCGTTCAAGCCG
A L G G K I N N V G L V E V P M G T T L R E I I Y E V G G G I P N G K A F K A V

6970 6980 6990 7000 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080
TTCAAACCGGAGCCATCAGGAGATGTATAACAGCTGACTTCTTGACACTCAATAGATTTCCGACTCGCTTACCGCTCTAGGTTCTATGATGGGTTTCAGGCGGTATGATGTTATGG
Q T G G P S G G C I T A D Y L D T Q I D F D S L T A L G S M M G S G G M I V M D

7090 7100 7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200
ACGAAGCAACTGCATGTTGACATAGCCAAATCTTCTTGAAGTTTACAGTGGAGAGTCTATGCGGAAAATGACTCCTTGTAGAGAGGCACAAAGAGAAATGCTTGAATACTTGAGA
E D N C M V D I A K F F L D F T V E E S C G K C T P C R E E G T K R M L E I L E R

7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300 7310 7320
GAATATCAGAGGCAATGGAACCTTGAAGACCTTGACAAGCTTGAAGAAGCTTGAAGAATAACAATCAAGTCAACTGCTTTCGCGGACTTGACAGACAGCTCCAAACCCAGTACTTCAAC
I S E G H G T L E D L D K L E R L A N T I K S T A L C G L L G Q T A P N P V L S T

7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400 7410 7420 7430 7440
CTCTTAATACTTACAGAGATGAGTACGCTGCTCAGCTGTTGACAGAAGTGGCCAGCGGGGTTTGTACAGCGCTTACAGACTTTCATAACAGACAAAGTGCATAGGCTGACTAAGT
L K Y F R D E Y V A H V V D K K C P A G V C T A L L E Y F I T D K C I G C T K C

7450 7460 7470 7480 7490 7500 7510 7520 7530 7540 7550 7560
GCGCTAGAGTGTGCTCCGTTACTGCTATAAGCGCAAGTTAAGGAAAAGCACGTAATAGATACAGATAAGTGCATAAAGTCCGCGCTTGTATGGATGCTTGTCTGTAACCGCTATAA
A R V C P V T A I S G K V K E K H V I D T D K C I K C G A C M D A C P V N A I I

7570 7580 7590 7600 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680
TTAAGAAATACTTAATCCTACTAAATATGAAAAGAGGTGTAGATGATGTTGGTGAATATTACTATAGATGGCAGACAGGTGACAGTTCCGGCTAACTCTACTGTGCTGATGCTGCCAGA
K K * M V N I T I D G R Q V T V P A N S T V L D A A R

7690 7700 7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 7800
GATATGGGCATAAATATACCAACTCTTGTATCTTAAAGACATCAATAAGACTGGCGCTTGCAGAAATGTGTCTTGTGAAGTTGAAGGAATAAGGAATCTTACAGACTGCTTGTACTTTC
D M G I N I P T L C Y L K D I N K T G A C R M C L V E V E G I R N L Q T A C T F

7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 7900 7910 7920
CCGTTAGAGACGGCTTGTAGTAAAGACGAATACAAGAGAGTAAAGAGACGCAAGAGAGACAACTTACAGCTAATACTTCAAAACACACAGAGATTGCCTGTCATGCTTTAGAAAC
P V R D G L V V K T N T K R V R D A R R D N L Q L I L S N H H R D C L S C F R N

7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000 8010 8020 8030 8040
GGAAGCTGCGAGCTTCAAGCTCTATGCGACGACATGGCCCTTTCAGAGCTTGATTTCCAGGCGCAAAAGAGCTTAAAGCCTGTAGACATGCTTCCCACTCGATAGTAAAGAGCCCAAC
G S C E L Q A L C D D M G L S E L D F E A P K E L K P V D M L S H S I V R D P N

8050 8060 8070 8080 8090 8100 8110 8120 8130 8140 8150 8160
AAATGCATCTTTCGCGAAGATCGCTGCTTGTAAACAGGTTTCAGGAAGTGGCAACTTGCATTTACAACACAGGGGTTGAAACTGAGTTGCTTCCCTGCTTGTCTCAACAGCATG
K C I L C G R C V A V C N K V Q E V G I L A F T N R G V E T E V A P A F A T S M

8170 8180 8190 8200 8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280
CGAGATCCATCATATACTGAGCAGTGCCTGAATGTATGCTGTTGACAGCTTACAGAAATAACAGACATAGAAAAGTTGGGAAGTCTGAAGATGAACTAAGCATGTT
A D A P C I Y C G Q C V N V C P V A A L R E K T D I E K V W E V L E D E T K H V

8290 8300 8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400
GTAGTTCAAGTTGCACCTGCGGTTAGGCGGCACCTGGAGAGATGTTCCGCAATCCGATAGGAACAGGGTTACAGGAAAATGTTCACTCCGCTTAAATGCTTGGATTCCAGAAGTGA
V V Q V A P A V R A A L G E M F G N P I G T R V T G K M F T A L K M L G F Q K V

8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 8500 8510 8520
TTCGACACCACTTTCAGCGACCTTACAATAATGGAAGAAGAACAGAGCTTCTTGGAGAATCAAAAACGGAGGAACCTTCCGATGATAACTTCTTGTCCGCTGGCTGGATAAGA
F D T N F A A D L T I M E E G T E L G R I K N G G T L P M I T S C S P G W I R

8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 8600 8610 8620 8630 8640
TACGTTGAGCACTTCTTCCAGAAATGCTTGAACAGCTATCTTCAAGTGCAGGAGCAGATGATGGGAGCAGTCTTAAGTCTTACTATGACAGAAAAGAACACATAGCCGCTGAG
Y V E H F Y P E L L D H V S L C K S P Q M M G A V L K S Y Y A E K N N I A P E

8650 8660 8670 8680 8690 8700 8710 8720 8730 8740 8750 8760
AACATGATAGTTGTTTTCAGTAATGCCATGTATAGCAAGAAGACTGAGTCCGCAAGGAAGAAATGAAAACCTTACCGGAAACAGGAGCTTGAACATAGTTCTTACTACAAGAGAGCTT
N M I V S V M P C I A K K T E S A K E E M K N V H G T R D I V L T R E L

8770 8780 8790 8800 8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880
GGCAAGATGATAAAGAGGCAAGGATGAATCAACGATCTTCAAGACAGCAATCTTCAAGAGCTTCTTCCGAGACTACACTGGAGCCGCTGTAATATCCGAGCAGCAGGCGGAGTTATG
G K M I K E A R I E F N D L Q D S N P D E F F G D Y T G A A V I F G A T G G V M

8890 8900 8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000
GAAGCTGCTATAAGACGGTTGCTGACATAGTAAAGCGCAAGAGCTTGAAGACATCGAATATACTGCGGTAAGGGGACTTGAAGCATCAAGGAGCTGCAGTTAAAATAGGCGATCTT
E A A I R T V A D I V S G Q E L E D I E Y T A V R G L E G I K E A A V K I G D L

9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 9100 9110 9120
GAGGTTAAGGTTGCGGTTGACACCGAACTGCAAAATCCCGAAAAGCTTATGGATTAGTTAGAGATGCAAAAGCTGACTACCCTTTATTGAGATAATGGGATGCTCAGGCGGCTGTGTA
E V K V A V A H G T A N A G K L M D L V R D G K A D Y H F I E I M G C S G G C V

9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200 9210 9220 9230 9240
ACAGCCGAGGCGCAGCAGCTGACTCAAGAAACCAAGGAAAAGTAAATGTGAAGCTTGAAGAGCAAAAGGCTCTATACACAGAAAGCAAGCTTGGGCAAGAGGAAAGTCTCACCAC
T G G G Q P H V D S R T K E K V N V K L E R A K A L Y T E D K L R D K R K S H H

9250 9260 9270 9280 9290 9300 9310 9320 9330 9340 9350 9360
AACGAGTCTGTTAAGAGCTTTATGAAGAGTACCTTGGAAAGCCTAACGGCCACAGGCTCAGAGCTTCTTCACTACTACAAAAGAGAGAACTTCTAACAGAATATACTGAGT
N E S V K R L Y E E Y L G K P N G H K A H E L L H T H Y K K R E L F *

9370 9380 9390 9400 9410 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480
ATTGCCAGTAACAAAGGAGGAGTGAACGTTGCTCCTGCTTTAGTTTTCACCAATATATTTCTTACTAATATGGTTAAAATGTTAGCATTTTATTATAATGGAATCATATATT
M N V A P A F S F F N Q Y I S L L I W L K M L A F Y Y N G I I Y L

9490 9500 9510 9520 9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 9600
TACATATTGAATTTATCAGAAGAGGAGTGGGAAAATGCAAAAAGAGATGTCGGCATCATACATAGCCAGGACTGGAATACTGCTTGCCTTGTCTTCCAGTTGGCTTTCAGA
H I E F I R R G V G N M K K K M S A S Y I A R T G I L L A L A L L F Q V G F Q S

9610 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680 9690 9700 9710 9720
GCTTTGCTCAGCCAGCCGCTAGGGCCGCTGTAAACATGGTCTCATACTAAGCACACTTACTGTGGCCCTGCTGCAGGAGTTACAGTGGGATGCTTTACGCCGCTTATAGCATTCTCG
F A Q P A V G P L V N M V L I L S T L T V G P A A G V T V G C F T P L I A F L L
9730 9740 9750 9760 9770 9780 9790 9800 9810 9820 9830 9840
TTGGAATTTATGCCGCTTTTCCGCTTGTGGCAGTGAATGCTGGGCAATTCACCTTTATGTAATAGTGTTCGAAGCTGTAAGAAAGCCTCTGGCGAGATACGGCAGGTTGCAGGGTAA
G I M P L F P L V P V I M L G N S L Y V I V F E A V R K P L A R Y G E V A G V I
9850 9860 9870 9880 9890 9900 9910 9920 9930 9940 9950 9960
TAATAGCATCAGCTGTGAAATATGGCTTCCCTGGCATTCTCTGCAGGAAACTGCTTGGCTTTTTCATGCCTAAGGTTCCGCCGAGATAGTGGTGCATTTTCATTGCTCAGCTGTATA
I A S A V K Y A F L A F S V R K L L V L F M P K V P P Q I V A A F S L P Q L Y T
9970 9980 9990 10000 10010 10020 10030 10040 10050 10060 10070 10080
CGGCATTGGTGGCGGAATACTTGCACCTGTAGTCTACAGGCTTTTAAAAAAATATTAATGTTTATTGTTGTCAGATGGATTAATTCAGAAAATGCAAGATATCAAAAAATAT
A L V G G I L A L V Y R L F K K N Y *
10090 10100 10110 10120 10130 10140 10150 10160 10170 10180 10190 10200
CATTTCAGAAAAGCAGATTTGACAGCATAGAAAATCAGCAAGCATAGAACAGGGGAGCGACATAGACGGCCGCCCTGTCTTATGTTGTCATATAAAAAACATACAGGGTATAAAT
----->-----<-----
10210 10220 10230 10240 10250 10260 10270 10280 10290 10300 10310 10320
AATTCAAAAAACAATCATGAAAAATGCATAAAAGAGACGAAGTTGTCAAATTTATAATATTTGCAATAGTTTGTATAAAAAATATAATAATACCAACAGTTTCAATAATTATATG

fdhB1
10330 10340 10350 10360 10370 10380 10390 10400 10410 10420 10430 10440
CATATGTTGGTATAGCTAATAAAAAAGAACAGTAGGATGAAATTCGCATAGGAGGGTTAAGTTGAAAAAGTTAATGTTGTAATAGACGGAAGAAGCATCAGTGTGCCTGAAAGCCAT
M K K V N V V I D G R S I S V P E S H
10450 10460 10470 10480 10490 10500 10510 10520 10530 10540 10550 10560
ACTATAATAATGGCTGCAAGAGAGCTGGAAATAGAAATTCAGCGCTTGTACGAACCATCACTTGAATAAGTGGCGTCTGCAGGATATGCGTGTGTTGAGATTGAAGGTTCTCGCAAG
T I I M A A K E L G I E I P A L C Y E P S L E I V A S C R I C V V E I E G S R K
10570 10580 10590 10600 10610 10620 10630 10640 10650 10660 10670 10680
TTAGAGACTGCATCAACAAGGTTTGGGACCGGATGAATGTTCAAACCAAGTCCGAAGGGTTATCAAGGAAGAAGACAGATACTGCAGTCTCTTGCACCAACCCGGAACGCAC
L E T A C S T K V W D G M N V Q T K S E R V I K E R R Q I L Q L L D N H P N D
10690 10700 10710 10720 10730 10740 10750 10760 10770 10780 10790 10800
TGCCCTACATGCCAGAAGGCGGCGAGTGCCTGCTTCAAAAGTATGCATACGAATACGACGTCAAGTTCCGGCAGCAGAGCTCGGAATAGACCTCAAGTCCGACAGGCAATCCCATAC
C L T C Q K A G E C L L Q K Y A Y E Y D V K F G D E S S E I D L K V D K S N P Y
10810 10820 10830 10840 10850 10860 10870 10880 10890 10900 10910 10920
GTATACAGGACGAGAGCAAGTGCATCTCTGCGGCAGATGCGTAAGGATATGCGCCAGATTCGGAAGATCTGCTCTTGTCTTGCACAAAGGGGACCCGAAATGAAATAGCGGCA
V Y R D E S K C I L C G R C V R I C A Q I P E R S V L C F A N R G T E M K I A A
10930 10940 10950 10960 10970 10980 10990 11000 11010 11020 11030 11040
GACTATGACAAGCAATGGGAGCTCAAGCTGCGTGGCGTCCCAAGATGCGTGGAGCTATGCCCGGTTGGGAGCCTTATGGACGGCAGGCTTATGGGAAGCACAGAAGCTGGGAGTCC
D Y D K T M G S S S C V A C Q R C V S V C P V G A L M D G R L M G R H R S W E C
11050 11060 11070 11080 11090 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160
GAAAAGGAGCATATAAATGCATCTGTGCGCAGTATGGCTGGCAGCTCGAATGCTTAAAAAGGAGCAAAATTTGCGGTGTCAGTCTATGGCCGCTGGCGGGAAGGCGCCCTTTC
E K E H I K C T V C Q Y G C D F E L L K K G S K I V G V R S M A P G G G R P L C
11170 11180 11190 11200 11210 11220 11230 11240 11250 11260 11270 11280
CTGAAGGGAAGGCTCACAAACGAGCTAAAATATGTCGATATGAGGAGCTTGGCGCTGTATACATGAAAAAGGGCAGGAGTACGTACAGACAAGCTGGGTTGAGGCGCTTGCCTTTCAC
L K G R L T N E L N Y V D M S E L A P V Y M K K G E E Y V Q T S W V E A L A L H

fdhA1
11290 11300 11310 11320 11330 11340 11350 11360 11370 11380 11390 11400
AGGCTGATAAACAGGATAGAAAAGCTGGAAGAAAGATAGTGGGTTTATAAAGGGAGGATAAAAATGGTGTAGTCAAGATAGACGGCCGGAGCTCGAGTGGCCAAAGGACTATACT
R L I N R I E K L E E R * M V L V K I D G R E L E V P K D Y T
11410 11420 11430 11440 11450 11460 11470 11480 11490 11500 11510 11520
ATACTCAAGCGTGGCAGGCGGGGAGCGAAAATACCACCTTCTGCTACGACGAGAGGCTTCAAGGCACGAGCGGGGATGCAGGATATGCTTGTAGAGATTGAAGGGCAAGA
I L K A C E A A G A K I P T F C Y D E R L S R H G A G A C R I C L V E I E G Q R
11530 11540 11550 11560 11570 11580 11590 11600 11610 11620 11630 11640
AACCTCATGCCATCATGTACTGAGAAGTATGGGAAGGAATCTCTGTATTACAAGAGCAGGAGGGTTCATAAAGGAGGGAAGGGCATACTCGAGTGTGTTCAAACCATCCGCTG
N L M P S C T E K V W E G I S V F T K S E R V I K E R K G I L E L M V Q N H P L
11650 11660 11670 11680 11690 11700 11710 11720 11730 11740 11750 11760
GACTGCCTTACATGCGAAAATCGGGAAGTGCAGGACTACTGCTATGAGTATGGTGTGACAGGATATAAAGGGCTCGAAGAGAGAGTTCGCTGTAGACGAGAGCAATCCG
D C L T C E K S G D C K L Q D Y C Y E Y G V T G I K G L E E R V L P V D E S N P
11770 11780 11790 11800 11810 11820 11830 11840 11850 11860 11870 11880
TTCTACAGCTTCGATCCGCAAGTGCATCTATGCGCAAGTGCCTAAGGGTGTGCGAAGAGCTGCAAGGCAACAAGAGCCTAATACTGAAAGAGGCTCTGTTGCCAAGGTTTCG
F Y T F D P D K C I L C G K C V R V C E E L Q G T R A I L I S E R G P V A K V S
11890 11900 11910 11920 11930 11940 11950 11960 11970 11980 11990 12000
ACTCAGTTTCGAGGAGGCTTAAAAATTCGCGTGTATCATGCGGAACTGCTTCTACTGCTGCTGGGAGCCTTGTGCCAAGAGCAAGACTGAACACAGGCTATGGGAAGC
T Q F E E G L E N S P C V S C G N C V S Y C P V G A L L P K S K T E H R V W E T
12010 12020 12030 12040 12050 12060 12070 12080 12090 12100 12110 12120
AAAAAGTTCAGGACAACTTTTATATGCGCGTAGCTGCCAGCTTATAGCTTAAAGGAGACGAGGTTGTGGTGTGCGAGCTGCAATGGGAGCTGGGAATGACGAGCTGCTT
K K V R T T C S Y C G V G C Q L E L I V K G D E V V G V Q P A M G A G N D G L L
12130 12140 12150 12160 12170 12180 12190 12200 12210 12220 12230 12240
TGCGTTAAGGGCAAGTTTGCCTATAACTTTGTAATACCCCTGACAGGCTCAAAAACCCGCTGATCGAAAAGGACGGAGTCTTGTGGAGGCGACCTGGGAAGAGGCTCTTTCGCTAGTG
C V K G K F A Y N F V N H P D R L K K P L I R K D G V L V E A T W E E A L S L V
12250 12260 12270 12280 12290 12300 12310 12320 12330 12340 12350 12360
GCTAAAAAGATCAGGATATAAAAAGTCAACACGGGGCCGATTCATTTGCGGGTCTTACCTCTGCAAGATGCACAAAACGAGGAGAACTATCTTTTCAGAAAGCTCTCGCGGCTGTTGTG
A K K I S D I K S Q H G A D S I A G L T S A R C T N E E N Y L F Q K L R A V V
12370 12380 12390 12400 12410 12420 12430 12440 12450 12460 12470 12480
GGGCAAAACAGCTGGACCACTGCCAAGGCTCTGCATGCTTCCACTGTTGAGGCTTGAACAACACTTGAAGCGGTGCTATGACTAACAGATAGCTGAGACGAGATACAACGAT
G T N N V D H C A R L U H A S T V A G L A T T L G S G A M T N S I A E T R Y N D
12490 12500 12510 12520 12530 12540 12550 12560 12570 12580 12590 12600
GTGATATTCCTTACAGGCTCAACACACAGAAAACCTCTGTAATAGCTGGCAAAATGAAGCAGGACGTAAGAAATGGAGCCAGCTGATAGTGGCTGATCCAAGGAGAAATGAGCTG
V I F V T G S N T T E N H P V I A A Q M K Q A V K N G A K L I V A D P R R I E L
12610 12620 12630 12640 12650 12660 12670 12680 12690 12700 12710 12720
GCCGACTATCGGAGCTTCTCTGCAGATAACGCCTGGCAAAAACATAGCGCTTTTGAATGCCATGATGAACGTAATAAAGCGAAGTCTTCAGGATAAGAATATAGAAGACAAG
A D Y A D V F L Q I T P G T N I A L L N A M M N V I I S E G L Q D K K Y I E D K
12730 12740 12750 12760 12770 12780 12790 12800 12810 12820 12830 12840
ACGGAATACGAAAGCTTGTGGCTTCAAAAAGGTACACTCCGGAAGAGCTCCGCAAAATACCGGAGTTGACGCGGAGGACATTAGAAAAGCAGCAAGAATATATGCAAGTCA
T E N Y E E L V G L A K R Y T P E E A A R I C G V D A E D I R K A A R I Y A S A

12850 12860 12870 12880 12890 12900 12910 12920 12930 12940 12950 12960
GACAAGCAGGAATATACTATGCCATGGGAATAACGCAGCATATAAGCGGTACGATATGTAATGTCGATATCCAACTGGCGCTGCTTTGCGGCAACATAGCGAAGGAGCGGGGGA
D K A G I Y A M G I T Q H I S G T D N V M S I S N L A L L C G N I G K E A A G

12970 12980 12990 13000 13010 13020 13030 13040 13050 13060 13070 13080
GTCACCCCTTTGAGAGCCAAAACAGCTTCAGGGCGCTCGCAGATGGGAGACTTCCGGGAGACCTTCCGGGTACCAGAAGGTTATAAGTCTGAGGTCATAGAGAAGTTTGAAGCGG
V N P L R G Q N N V Q G A C D M G G L P G D L P G Y Q K V I S P E V I E K F E A

13090 13100 13110 13120 13130 13140 13150 13160 13170 13180 13190 13200
GTATGGAGCGGAAGCTTCCAGCAAGTGGGACTTACTGTGCGCGGAGTGTGACTGAAGCCTCAAACCGCAACATAAGGATGATTATATAATGGGAGAAAACCCAAATGGTTTCAGAC
V W S A K L S S K V G L T V P E M L T E A S N G N I R M I Y I M G E N P M V S D

13210 13220 13230 13240 13250 13260 13270 13280 13290 13300 13310 13320
CCTGACATAACCCATGTAAAACATGCGCTGGAACATCTGGATTCTCGTGGTGCAGGATATTTCTGACCGAGAGCTGCTGAGCTGGCAGACGATGCTGCTCCGGCGGCTCGTTTGGC
P D I T H V K H A L E H L D F L V V Q D I F L T E T A E L A D V V L P A C S F A

13330 13340 13350 13360 13370 13380 13390 13400 13410 13420 13430 13440
GAAAAGGACGGCACTTCTCGAAGCTGAAAGAGGGTTCAGAGGGTGGAGAAAGCGGTGAATCCGGTGGTGTATCAAAGCCGGATTACGAGATATTGATTAACTTAATGAAAAGCTG
E K D G T F S N T E R R V Q R V R K A V N P V G D S K P D Y E I L I N L M K K L

13450 13460 13470 13480 13490 13500 13510 13520 13530 13540 13550 13560
GGTTACAATGCTTTTACAAGGATGCGTCTGAAATATTCGATGAAATAGCAAGCGTAACTCCGCAATATCGCGCATAGACTATAAAAGGCTAGAGGACATAAACGGACTCCAGTGGCCA
G Y N A F Y K D A S E I F D E I A S V T P Q Y A G I D Y K R L E D I N G L Q W P

13570 13580 13590 13600 13610 13620 13630 13640 13650 13660 13670 13680
TGCCCCAAGAGCATCCGGGAACAAATACCTTCAAGGGATGCGCCAGAGGCAAGGGTGTGCTGCTGGAGTATGCTCAAAGCGCGGAGATGCGGACAGTACATAT
C P T K E H P G T K Y L H S K G C A R G K G L F V P C E Y A Q S A E M P D S T Y

13690 13700 13710 13720 13730 13740 13750 13760 13770 13780 13790 13800
CCGCTTGTGCTTACAACAGGCAGGATACCTTACCAGTATCACACTACTACAATGACCCGAAAGACTGAGGGTATAAGCAGTAACCTATCCGAATCGTTTATAGAGTCAATCCTTACC
P L V L T T G R I L Y Q Y H T T T M T G K T E G I S S N Y S E S F I E V N P S T

13810 13820 13830 13840 13850 13860 13870 13880 13890 13900 13910 13920
GCAACAGCTCGGAATAGAAAGACGGGAGATGTAAGGGTGGTGTCAAGAAGGGGCGAGCTTGAGACGAACTGAGAGTACAGAGATAGTTGAGGAGATAGTATTCATGCTTTC
A N K L G I E D G E M V R V V S R R G S V E T N V R V T E I V E E D V V F M P F

13930 13940 13950 13960 13970 13980 13990 14000 14010 14020 14030 14040
CACTTTGCAAGGGCGCGCAACATATAACAACTCAAAGCTCGATCCTAAGCGCAAGTATCCCGAGCTAAAGGTTTTCGCGAGTGGAGATAGACATATAAAATAAAGAGAATAATC
H F A K G A A N M I T N S K L D P K A K I P E L K V C A V R I E R I K *

14050 14060 14070 14080 14090 14100 14110 14120 14130 14140 14150 14160
AATCAGGCACCTGGGGAGCGCGGAGTTTGAACGTAGCATAATAACTGTTTGTGACAGGGCTATGCGAGGAAAGGCTTGTATGAGAGCGGTCGCGAAAATAAGCGCATACTGAGTGAG
→ M N V G I I T V S D K G Y A G E R L D E S G P E I K R I L S E

14170 14180 14190 14200 14210 14220 14230 14240 14250 14260 14270 14280
AACGGCATAGCTATTCTGAATATGTTTGTCCAGATGAAGAGGGAATGATATATAATGAAATAGTAAGAATGTCGATGAGCTCAGGCTAGATCTGTCTGCTGAGTACAGGAGGACAGC
N G H S Y S E Y V I V P D E E G M I Y N E I V R M C D E L R L D L V L T T G G T

14290 14300 14310 14320 14330 14340 14350 14360 14370 14380 14390 14400
GGCTTTTCAAAGGGGATGACTCCGAGGCCACACTTAAGCAATAACAGGAATGCTCCGGCAATTCGAGGCGCAATAGGCAAAACAGCCTTGCATACAAAGGGCGGCGCTT
G F S K R D V T P E A T L K A I T R N A P G I C E A I R Q N S L A I T R R A M L

14410 14420 14430 14440 14450 14460 14470 14480 14490 14500 14510 14520
TCAAGAGCCGTATCTGGAATAAGGGGGGAAACGATAAATGTAATCTTCTCGGAAGTCCAAAGGCGGTAAGTGAATCACTTGAATTTGCAATGACTCAATAGAACACGGCGTGCAGATA
S R A V S G I R G E T I I V N L P G S P K A V S E S L E F A I D S I E H G V Q I

14530 14540 14550 14560 14570 14580 14590 14600 14610 14620 14630 14640
TTAAAGGGGTTGCTATCGAGTGTCAAGAAATAGAGGGGACAAAATATTTGGCAGTCAATAATCTTGGCGGAGGAGCAAGCTCCCGCATGGTTTGGACAAGCAGTTTATAGAGA
L K G V A I E C A R K *
M C K E I E G Q K L F G S A I I L A G G R S S R M G F D K Q F I E I

14650 14660 14670 14680 14690 14700 14710 14720 14730 14740 14750 14760
TAAATGAAAAGACTCATGAAATTAATCTCCGGCAGGCTTGGCGAGATCTTCGATGAAATATAATAGTTACAACAGGCGGAGATGCATAGCTGTCTGCAATATAAGTCAAGTCAAG
N E K R L I E I T A G R L A Q I F D E I I I V T N R P E M H S C C Q Y K L T S D

14770 14780 14790 14800 14810 14820 14830 14840 14850 14860 14870 14880
ACATAATAAGGAAAGGCGCTTCCGAGGCATACATGCCGACTTCTCGTCCGGAAGCGAATTTGTGTTGCAATAGCATGCGACATGCCGTATATAAATGGACTACATCGAGC
I I K G K G P L G G I H A G L L A A E S E F V F A I A C D M P Y I N L D Y I E H

14890 14900 14910 14920 14930 14940 14950 14960 14970 14980 14990 15000
ATATGAAATCGTCTGAGAGCAGTATCAAAGCTGGAGAAGATATAGATCGTGCATAACTCAAAGGGAGAAATGGATTGAGCCCTCAATCGGTTCTACAGAAAAGCCCTAGTTAAGA
M K C V V E S S I K A G E D I D A C I T L K G E W I E P F N A F Y R K S L V K S

15010 15020 15030 15040 15050 15060 15070 15080 15090 15100 15110 15120
GCATTGAGAGCATTGGAAGCGCAAGAGGGCGGTATTCTGCTTGAACAGCTGAATACGACATATAAAGTGAATTTGAGGGCGCAAGATTCAGCCGAGGCTGGAGCATGTTTT
I E E H L E S D K R A V Y S L L K Q L N T T Y I S E F E A R R F S P D W S M F F

15130 15140 15150 15160 15170 15180 15190 15200 15210 15220 15230 15240
TCAACATGAACACTATGAGGAGCTCCGGCAGTATTCACAAGTACACAAAGAGGAAAAACCCAAATGAAAAGTCCGAGATCTTATGATATAATAAATACAATGACGAAAATTAACAAG
M E K S R F Y D I I K Y N D G K L T K
N M N T M E E L R Q Y S Q V T Q E E K P N G K V E I L *

15250 15260 15270 15280 15290 15300 15310 15320 15330 15340 15350 15360
TGGGAAGCAGGATAGTCCGAGTTTGGCTGGATCTTTTCGTCGATGGGGGCAATTTGTGAGGCTGCTTTGCACTCCGGAATCCCTTGAAGCCCTGGCGGTAGGTTTTTGAAGTCA
W E D E V V A E F W L D L F V D G A K F V R L L C T P E S L E S L A V G F L K S

15370 15380 15390 15400 15410 15420 15430 15440 15450 15460 15470 15480
GATGGAATAATATCTTCAAGAGAAAGCATAAAAGATATAAGATGGATACACAAAAGAGGCTGTTTTGTAGCTACGAGCAGCCCTGAAAGCTACAAAAGAGAAGATTGACGGCAAAAA
D G I I S S R E D V K D I R V D T Q K A V F V A T S S P E A T K E K I A G K K

15490 15500 15510 15520 15530 15540 15550 15560 15570 15580 15590 15600
GTCACATAGTGGGAACAAAGAGGGGATGTTTCGGATTCGCTTTATGAGACAAATGCTCCGAAAGCCAGGCGGACATCGAAGTCCGACATAGACAGGATCTCGATATTGTAAGTGT
V N I V G T S K G I V S D S L Y E T N A P K A R P D I E L D I D R I L D I V S D

15610 15620 15630 15640 15650 15660 15670 15680 15690 15700 15710 15720
TTTTCTCAATGTCAGTCTGTTTTCTGCAACGGGGCGCTCACAGTTCGCCCATATCGGAGCGGAGAGCTGCTTCAAGAGGACATTGGCAGGCACATCCGGTCGATAAA
F S S M S G L F S A T G G A H S C A I S D G Q K L L D F K E D I G R H N A V D K

15730 15740 15750 15760 15770 15780 15790 15800 15810 15820 15830 15840
ATTGTCGCAATTTGATGCTTGAAGGATAGACACATCAGACAAGCTGCTCATACTCAGCGGAAGACTCTTTCAGAGATGCTGCTAAAGGCCATTAATGCGGGTTTTATGGAGTTATT
I V G N C M L E G I D T S D K L L I L S G R V S S E M L L K A I N A G F Y G V I

15850 15860 15870 15880 15890 15900 15910 15920 15930 15940 15950 15960
TCAAGGCGGCACGACGATGCGCCATAGATATTGCAAGAGAGAATGGAATAACTCTGCGGCTTTCACGCGGAGAAAATGAATATATACACAGATTTCCGAGTCGTCATTT
S R A A P T D A A I D I A R E N G I I L C G F A R G R K M N I Y T D F P S R H F

```

      15970      15980      15990      16000      16010      16020      16030      16040      16050      16060      16070      16080
TAAAGCCAAGGCCATGAAATGCTGACCCAGTGGGCCTTTTGAGAAATTGGGGGCCTCCCATATTTGGAAAGGAGAATCTTAAACCACTGGCTCCACTTGGATGATTGCTGC GCGGGCG
*
      16090      16100      16110      16120      16130
TTTAAATGTACAAGAGCAATTATGGATGGAGCATAGCTGACTTGTTTGAATTC 3'

```

Abb. I.1: DNA-Sequenz der Genregion des *hym*-Operons sowie des *fdh*-Gensatzes I von *E. acidaminophilum*. Nur der *antisense*-Strang ist gezeigt. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der einzelnen Gene sind unterhalb der DNA-Sequenz im Ein-Buchstabencode dargestellt. Stop-Codons sind mit * markiert. Potentielle Ribosomen-Bindestellen sind fett gedruckt. Potentielle Terminatorstrukturen sind durch ---> <--- gekennzeichnet. Durch *primer extension* nachgewiesene Transkriptionsstartpunkte sind fett gedruckt, sowie mit einem kleinen Pfeil unterhalb der Sequenz gekennzeichnet. Nachgewiesene N-terminale Sequenzen von isolierten Proteinen sind doppelt, sowie potentiell am Aufbau von Eisen-Schwefel-Zentren beteiligte Cysteine einfach unterstrichen. Die postulierten FMN- und NAD(P)-Bindedomänen in HymB sind kursiv gedruckt und unterstrichen.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
GAATTGCGAAAAATATTTTCTGCGCGGTGATTTTCCAGGATGTAAATGACTATTTATGAACGTTTTGAGGTTTTATTCTGGGCGTGTCTCCGGATGTCTTTTTCGTTATAATTTT
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
ATCAAATTAATTCGCCACTATTCAGTTTTGAGACTTGCATGCTTTGCAATTACCTTGTTTAAAAATCCAAATATTCAGACACAGTATGCAGCGTCTAAACATCCCGACAAGGGTG
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
GATTGTGCTTTTGTCTCCTGTCACAAAAAATAAAAAAACCCGCTGAGCAGTTGTATGTTTTAAGGAAAAATTCAGTTCTCTGTCCTTTTACCTGAGAGATTCAITTTAATCGCTTG
370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
ATCTAAAAAGGGATGAGCTTTTTATTATATAAAGATCTCAATTAATTTGCTCCTTCGGTGCCTTATATGGTCTCTCCAGAGTATCGCTTGTATGACAGTCTTAAGCCTGAAAGCTT
490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
TACTTCTTCGGCGCCCTCATGGGTCTCTGCCACCTTCATCCGATAAAGATATTTGGCAATAATTTGGATAACGACAGTACCGCACTGCGTAATTTGTTATATATATCGTCAATA
610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720
TATAAAGTCAACCGTATTTTGTATTTAGTCGACCGGTACTGCGACATGCTCTTTTATTTTTGTGTGTGATATTTTCATTGGTGAATTTCTATCATTTCTTTCACGTTTACATCTA
730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840
TCCCATATGTGAATAGTTTCCCGGTGACAGTGCATAATATTGCACCCACTCCAGTCCCGGCTTTTTGGCAGACTTCCAGGCTAAATATCAGTTAAGTCCATCATTTTTCGCAACC
850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960
AGCAGAACCGCTTTAATAGAAATAATATTAACTTTTTCATTTTATCCGGGCCAAATGCCCTTTTTGTCATATATACTATTATTTATGCTTTTTCATCGCTTCTGTTTGCCTG
970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
TTTTACAGCGGTTGGATATTATTGAGTCTAGACAAATCCTGGATTAAATGGTTATTATTTTACTTAAAAATTTGTTATAAAATTTATTCTATTTTGTCATAAACACAATTTATTATGC

1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
TTTTTAAAAAACAATTTATTGGGTCAAATTTGGTGGACGCTCTTCCCAATCCACTAATCCATACATTTAATTCATACATTATATAAGGAGGAACATTAAGTAAACACTTACAATTA
M V T L T I N
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320
ACGGCAGAGCGTTTCCGTGTGCGGAAAGCAGCAGATAAGAGTCCGCAAGCTTGGTATTGAAATCCCGCTCTCTGCTACGACGAGAACCTCGAGCCCGTAGGCGCTTGCAGCG
G Q S V S V S R K S T I I E A A K L G I E I P A L C Y D E N L E P V G A C R L
1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
TTTGCCTGTAGATGTGAGGCGCAAGAGGCTTTTGTACTGCTGCTGACTCCGGTTGCCGAGGAATGGTAGTGAACAGAGACCGAAAGGTTATAGACGCTAGAAGAGGTGTT
C V V D V Q G A R G L L T A C S T P V A E G M V V E T E T E R V I D A R R G V L
1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560
TTGCGCTTCTGTGATAAACCATCCGAACGATTGCTCACTTGCAAAAAGCCGGTTCTTGTCTTCCAAAAATTTCTTCAAGTATGTAATTCGACGCTTTCGAAAAAGGTTG
R L L L D N H P N D C L T C E K A G S C L L Q K Y S Y K Y D V K F D A S A K G A
1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
CAAGGAGACCGGACTTCTAGACGATTCACACCTTATATAATGAGAGACGACAGCAAGTGCATCTTTCGAAAAATGGTGTGAGTATCGGACAAAGTTTCAGAAAGAGCGTCTTG
R R A G L L D D S N P Y I M R D D S K C I L C G K C V R I C G Q V S E R S V L A
1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
CTTTTTAGGAGAGGCTTCGACACTAAGTTGTTTTCGACGAGACGCTTCAATGCGCAATCAAAATGTTTTCATGCTAAGATGCGTATCGGTATGCCCTTACCGGAGCTCTTATAG
F S G R G F D T K V V F D G D A S I A E S K C V S C L R C V S V C P T G A L I D
1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920
ACGCAAGACACAGGACTTACAGACTTGGGAAGTCCAACTGTTGCTGTTAAATGCAAGCAGTGGCAGCAGCGGATGGGACTTTGACCTTCTAAAAAGAAACCGCGAAACCGTTGCCA
A R A T G S Y R P W E V Q T V A V K C K Q C D S G C D F D L L K R N G E T V A I
1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040
TCAAGCCGACCCACTACAAAGCGGAAGACTCTTTGCTCAAGGGCAGACTTGCAGACAGGCTTGAATACATAAGCTCAGACAAGCTCAAATCTCCTCAGATAAAGGAAAAAGGTTCTC
K P Q P P T S G R P L C L K G R L A T E L E Y I S S D K L K S P Q I K E N G S F
2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160
TCAAAATATCGAGTGGTCTGAGGCCCTGGGACTCGACAACCGTTTCAAGATAATTTGATTTTAAAAATAAGCAGCGGAAAGCGGAAAAATCACTCTTATTCCGGCTCTGGCGGG
K I C R W S E A L G L D N T L S K I I D F E N K A G E S G K *

2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280
ACAGTCAGGATGCTGTTTCTATCTGCTGCCCTGCTGATAATTTCAAGCCATGATGAGTGCATGCTGTTAATAGGAGGTTTATCCGAATATGATAAATGACAAATAACCGCACGACGG
M I N V T I N G T T V
2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
TGAGCGTCCCGAAGTCCACACTGCTTGGGATGCAACGCTGACGGGTAAGCTCCCTCATTTCTGCCACGCAAGACTACAGGCGCACGGCCCTGCAGGATATGTTGTTGATG
S V P R K S T L L E A C N A A G V S I P T F C H D E R L Q A H A A C R I I C V V E
2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520
AAGTCGGGAGCGAGGCGCTCATGACTGATGCTGCACTCCGGCGGTAGACGAAATGGACGTACAGACTCAGCAGAAAGAGTAAATCGAAGCAAGAGGCGTTCTAAGCGTATGATG
V A G A R G L M T A C S T P A V D G M D V Q T H S E R V I E A R R G V L S L M I
2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640
TAGCAAAACCCCTTGTACTGCTTACATGCGTAAAATCCGAGACTGCAGACTTCCAGGACTACTGCTACGAGTACGGCGTCAAAGAGCTGAATTCGAAGGTGCAAAGAAAGAAATATG
A N H P L D C L T C V K S G D C R L Q D Y C Y E Y G V K E P E F E G A K K N Y E
2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760
AAATAGACGATTCGAATCCTTTCTATATAAGCGACGACAAGTGCATAAGCTGCGGAAGTATGCAACGAGCTTCACTGCACTGGCGCAATAGACCTTGGCTGAAAGGG
I D D S N P F Y I S D Q N K C I S C G R C V R V C N E L Q C T G A I D L A E R G
2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880
GTTTGGACACACGCTGGCAACTCTTTTGTATGGATCTTGAAGTCCAAATGCGTACTCTGCGGAAACTGCGTTGCCCTTGGCCCTGCGGAGCTTGTATGCCAAGAGCAAGGAGC
F D T H V A T P F D V D L E K S K C V S C G N C V A V C P V G A L M P K S K E L
2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
TCTTCAGGCAATGGGAGACTAAAAAGGTAAGAATACATGCTCATATTGGCGGTAGGCTGCCAGATGGATCTTGTAGTAAAAAGCGACACTTGGTAGGCGCAGAGCCAGCCCAAGCGGAC
F R Q W E T K K V R T T C S Y C G V G C Q M D L V V K G D T V V G A E P A N G P
3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120
CTGCCAACGAGGACTTTTGTGCTCAAGGGAAGATTCCGCTACAAATTCCTTAGCCACCCGACAGGCTCACAAGGCTCTTATAAGAAAGAACCGGGAGCTTTGTTGAGTCTTCTCGGG
A N E G L L C V K G R F G Y K F L S H P D R L T K P L I R K N G E L V E S S W D
3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240
ACGAGGATACAGCTTGTTCGAAAGAGATGAAGCAGACAAGGAAGAAATTCGGAGCTGATTTCGTTGGGCTTACATCTGCAAGATGTACAAATGAGGAAACTACCTCATGCAAA
E A Y S L V A K K M K Q T K E E F G A D S L V G L T S A R C T N E E N Y L M Q K
3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360
AGCTTTTCAGAGCGGTAATAGGCACTAACCAACTCGATCACTGCGCAGCCTTGCAGCTCCTCAACGGTTGCAGGTCTTGCAGCCACACTGGGAAGCGGAGCGGATGACAAACAGCATAA
L F R A G A V I G T N N I D H C A R L U H S S T V A G L A A T L G S G A M T N S I T
3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480
CTGAAGTCAAGGATTCAGAGCGGATATTCTGTAATAGGCTCAACACTACAGAAAACCCCTGTAATAGGCGCAATGATGAAACAGCGGTTAAGAAAGGGCGCAAGGCTGATAGTTGCCG
E V K D S D A I F V I G S N T T E N H P V I G A M M K Q A V K G A K L I V A E

GTCCCCAAGGCTGAAGTTGTCCAGGACGTAGCCACCTTGGTGTCTCCTTGATACCTCTATGTTGTCCAGATGGCCATCATGAGCAGATAGTCGCCGTCGGTATCGGCTATTACCTC
6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720
CAGGGGTTCCGACTTCAACAGGTCCTCGATCGGGTGAACCAACAGGAGAACTATGGGAGATACAACAGAGGTCTACCGGTAGTACTCGTCTATCAGCGAGGCGATAGCGATAAATGAG
D G L S F N D L V Y G V K T D E K I G E I N S W I A M M L L Y D G D T D A I V E
CACGTCGCCAACGACCTGTCTGCCCTTTGAATTTGCCAGTTAAGACGCTTTACCTGGTCCGGATCCTGCTCCAGTAGTCGAAGAACCAGGTCGAGAATCCACCTTATATGCTGGCC
6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800 6810 6820 6830 6840
GTGCAGCGGTTGCTGGACGACGAAACTTAAACAGGTCATTTCTGGAAATGGACCGCCCTAGGACGAGGCTCATCAGCTTCTTGTGGCACAGTCTTAGTGGAAATATACAGACCGG
V D G V V Q R G K F K D W N L R K V Q D P D Q E S Y D F F V T D S D V K Y T Q G
GCCTATTCAACGGAATCCTCGGTAAATCATCGCCGAGCTTATTATGCTAATGTCATCCGTGTATATATGTTTTCGGTGAAGTCGTCGCTGAGATTCTTTATGGTCCCGCTGTTTAT
6850 6860 6870 6880 6890 6900 6910 6920 6930 6940 6950 6960
CGGATAAAGTTGCCTTAGGAGCCACTTTAGTAGCGCCTCGAATAATACGATACAGTAGGACACATATAACAAAAGCCACTTCAGCAGCGACTCTAAGAAATACCCAGGGCACAAATA
G I E V S D E T F D D G S S I S I S I D F T Y I I N E T F D D S L N K I T G T A A
CTGGGAGTACTTCACTATAGTACCACATCCACTTGGCTTTGAGGTATTCGTATTCGTGGAATCCTCGAAGGCAAAACCCGCTTGGAGCTGTCTGGGTACAGGACTTTATTTCAAC
6970 6980 6990 7000 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080
GACCCCTCATGAAGTATCATGGCTGAGGTGAGACCGAACTCATAAGCATAAGCAGCCTTAGGAGCTTCCGTTTGTGGGCAACCTCGGACAGACCCAGTCTCGAAATAAAGTGG
Q S Y K V I T G V D V R A K L Y E Y E D S D E F A F V R K S G T Q T L L K I E G
CCGACCGGCTTCCGTAATCCAGCAGCAGCGCTACTGGTCAATCAAGGCTGAAGTTCGCTTCTACGTAACACAGTCCACCCGATGATCCCATATATTTGACCTTTTGGTTATA
7090 7100 7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200
GGCTGGCGCAGAGCATTAGTGTCTGCGCATGACCACTTAGTGTCCGACTTCAACGGAAGTGCATTTGTCAGTGGCGTACTAAGGTTATATAAACTGGAAAACCAATAT
R V A D G Y D L L V G Y Q D I V L S F N G E V Y V V D G A H N G Y I K V K Q N Y
GAATTCATTGACGTCGACCTTGAAGAGATGCTTTCAGACCCGCTCTTACCTTTTCCCTCCATTGTAAGAGTATGCAAGCTTTTCTGCAAGCTGGTATGAATCAGGAATGCCCTT
7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300 7310 7320
CTTAAGTAAGTCTGACCTGCGATACTTCTTCAAGAACTTGGCCGGAATGGGAAAGGGGAGTAACATTCTCATACGTTTTCGAAAGACGTTCCAGCATCTTAGTCTTACGGGAA
F E N L S S A S I S E S A G A R V R K G G N Y S Y A F S E A L Q Y S D P I G K
TAGCCTGAAGTTATGCTTTTGGCCGTTTGGCCTCCGACACCCCTCGAATGTCCTTCCGAATTTCTTGAACACGATAGCAGGCTTTGAGTTAGCGCTCTCGTCTCGCTCCCTAT
7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400 7410 7420 7430 7440
ATCGGACTTCCAATACGAAACCGCAACCGGAGGCTTGGGAGAGCTTACACGGAAGCTTACAGGACTTGTGCATCTGTCCGAACTCAATCGGAGCAAGCAGGAGGAGGATA
L R F T I S K G N A G G S V R E F T G E S N N R F V Y V P K S N A S E N E S G I
CCTTATGACGTCGCAATCTGAAGGGCCCGAAATCCGCTTTCGACGCGCTTTCGCAAGCACCATAAAATCATAGGCGCTTTCGCGCTTTTTTAAATCAATCTGTCTTACTCTC
7450 7460 7470 7480 7490 7500 7510 7520 7530 7540 7550 7560
GGAATCTGACGCGTCTAGACTTCCCGGGCTTTAGGCGGAAGCAGTCCGCGGAAAGTTCCTGGTGCATTTTAGTATCCGCGCAGAACCGCAAAATTTAGTTAGACAGAAGTGGG
R I V D G I Q L A G F D A K Q V G S E L V V Y F D Y A T K G N K L I L R D E V G
GCCCTCTGTGCAATGCGGATACGCTTCTTCCGCTCCGACTTTTTTATACAAAATCCCGGAGTCCCATGATACAGATGGCGTACTCCAGCTGTCTTTTTTACAGCAGAA
7570 7580 7590 7600 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680
CGGAGACACAGTTACGCTTATCGCAGCAAGGAAACCCGAGGCTCTGAAAATAATGTTTATGGGCTCAGGCTACTAGTGTCAACCCGATGAGGTCGGACGAAAGGCTGCTGCTT
G E T D L S S G I S S G I S S I S I S I D F T D G S D W S V L N A Y L R D K K V N F
GCTGCCCCAGGATCCTCCCCAGAAGCTTTCATAATCATCGGGATCTACAGTCTCGCCGTCAGCATGACTATAGAGTCTGAATCCACGTCGATATAGCCCTCTCGCCCTTAAGCCT
7690 7700 7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 7800
CGACGGGTCCTGAGGAGGGGCTTTCGAAAGTATTAGTAGCCCTAGATGTACAGCGGAGCTTCTGACTGATATCTCAGACTTAGGTGAGCTATATCGGAGGAGCGGAAATTCGGA
S G W A D E G L V S E Y D D P D V T E G D L M V I S D S D V D I Y G E E G K L R
TATCATCGGCTATGCTTCTCAGCGTACCGGTTTCAACCTCATTCATGCTGCTGACAGGCGCGGTTTGCCTGAGCCGAGGAACTGGCCCTGGATACGTAAGATGTTTTCATCCTT
7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 7900 7910 7920
ATAGTACGGATACCGAAGACTCGATCGCAAAAGTTGGAGTAGTACGAGCAGTCTCCCGGCCAAGGACTCGCCCTCCTGACCGGACTTATGCATTTTCAAAAAGTAGGAA
I M G Y P K E A Y A N E V E N M G A S L A P N G S G S S A R S V Y L I N E D K
GTCTAGTAAATCCACCTCTCCCGGGCTATGATATGCCCTCCGATTCGGAATTTGCTTTTCCGCGCTTTTTAATGCGCCCTTCAATCTCCGAAATCGCTTTGATCTCTC
7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000 8010 8020 8030 8040
CAGATGCATTTAAGTGGCAGAGGGCCGACATACATACGGGAGCCCTAAGCACTTATAAACGAAAGCGGCGAAATACCGCGGGAAGTTAGAGGCTTAGCGAACATAGAG
D V Y F E V T E G P Q I Y I G E P N T F I Q K E G S K L A G E I E S D S T I E
AAATCCATGCTCTGCGCATCCAGGACTCATGACCTTATAAGCCTTGGCCCTTATCTGGTATATGCCCTCTTTTCCGTCATAAGCACTTTCGCCCTGCTTGGCCGAAGAGGTA
8050 8060 8070 8080 8090 8100 8110 8120 8130 8140 8150 8160
TTTAGGTTACGAGACCGTAGTCCATCGATACCTGGAATATTTCGAAACCGGGGATAGACCATATACCGGGAGAAAAGGAGTATTCGTAAGACGGGAGCAAGACCGCTTCTCCAT
F E M S Q A D L Y S M S R I L R A G R I Q Y I G R K E T M L M R G E N Q G F L Y
TTTTCCGTAAGGCGGTTTTTGGACATGAGAGCCGATCTCCCGCCGAGAGATGCTGAGTCTCGCTTCCGCTCCCGAGAGTATCCCAACTCTGCGCCCTGGATATGATGTTGGC
8170 8180 8190 8200 8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280
AAAAGGCACTCCCGCAAAACTGTACTCTCGGCGTAGAGGGGGCGGCTCTACAGACTCAGAGCGGAAAGCGAGGCTCTCATAGGGGTTGAGACCGCCGACTATACATCAACCG
K G H L A N K V M L A N D G R L S A S H E G E A G S L I G L E A A K S I Y N A
GGCCAGCTGCCCTGCACATAGGAGTCAATGTAGCCAAAGCCTTTACAAGCATGCGCGCGCTGGGCTTTGTGACGCTCTCGCGGGGCTGAAGCTTCCATCTCGAAGCCTCTCGT
8290 8300 8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400
CCCGGTGACGCGGCTGTATCTCAGTAACATCGGTTTCGTAGAATGTTCCGACCGCGCGGAGCAGGAGCACTGCGAGAGCCCGCGGACTTCAAGGTTAGAGTTCGGAGGCA
P W S G Q V Y S D N Y G F C R V L M A A A Q A R T V S E A P R F S G D E F G R T
CATCCCCATGCTTACTGCCATGCTCACATAGTATGCGACACCTGTCCCTTCAACGCTGTGGAATTTGCTCACCTTCGAAAGCAGAGCCGATTTTTCAGTCCCGACGACGCTAC
8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 8500 8510 8520
GTAGGGTACGAATGACGGTACGAGTATCACTACGCTGGTGGACAGGAAAGTTGCGAGACACTTATAAACGAGTGGAAAGCTTTCGCTCTCGCGCTAAAAGCTCAGGGCTCGTGGGATG
M G M S V A M S V Y H H S W R D R E V D T F I Q E G K S L L A A N E L G L V G V
AAGCAGCTTTGCAAACTCCTCCCTTGTATGCGCTGCTCCGGTGGAAATTTGCCGTCCTTCCGTTTGAAGGCAAGCCCATGAGAAATCAGCGCCCTCTGAGCCTTTGCGCT
8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 8600 8610 8620 8630 8640
TTCGTCGAAACCTTTGAGGAGGGAACAATACGGGACGAGGCCCACTTAAACGGCAGGAGGAAAGCGCAACGTTCCGGTTCGGGTACTCTTTTAGTCCCGGAGGACTCGGAAACCGCA
L L K E A F E R T I G Q E H F K G D E K G N A L G L G M L F D A A E A Q A K A S
CACGGCATAAACCGTCTTTTATAGCCGCTTCTTCTGCACTGCTCTTCTGGGCGCAGCCTCCTTAGGCTCATCAAGGCTGCTCTTTTCTGCTCCGACGCGCTTAGGCGTTTC
8650 8660 8670 8680 8690 8700 8710 8720 8730 8740 8750 8760
GTGCGGTTATTTGCGAGGAAATAACCGCCAAAGGACGTGACGGAAGGACCGCGCTCGGAGGAAATCCGAGTGGTTCGAGCGGAGAAAGCAGGCGTCCGAGAAATCCGCAAG
V A Y V T E K N A P E E Q V A E E Q A A A E K P E D L A A E K Q E A A T K P T E
CGGCGAGCTTCTGGCGTATGACACCTGACCAAAGTCAAGGCTGTGTCAATAAGGAGCAAAAGGCTGCTGCTTAATTCGCTGTTAAGTCTCACTATACCGACCTCCGTTGGAT
8770 8780 8790 8800 8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880
GCCGCTCGAAGGACCGGCATACTGTGAGTGGTTCCTGCTCCGACACAGTATTCTCCTGTTACCGACGAGCGAATTAAGACGACATTCAGAGTATGATGGTGGAGGCAACCTGA
P A A E Q G Y S V Q G F T L A T T L L S C I A A R K I R S N L R M
<--- s1pB
GCTTGAATATACTAGAATCCGTTGAATCCGAGATAAAAATCTATTGAAAATATGTTGCTTAAATGCGAGTAAACAAGTTTCTTAAATTCATTTTCTTCTGATCTTAGCCATCAAAT
8890 8900 8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000
CGAACTTATATGATCTTAGGCAACTTAGGCGTCTATTTAGATAACTTTTATAACAGAAATACCGCTCAATTTGTTCAAAAAGAAATTAAGTAAAAGAAAGACATGAATCGGTAGTTTA
* N M K R E Q I K A M L D
CATCTAGCGCAGCAACATACCTCTCTTCTATGTTCAAACATATCTTTTGGCAACTTCTCGCTATAAAATATGTTGTTGGAAATTTCTATCTTCAACATTGAAAGCCATAATCTTCAT
9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 9100 9110 9120
GTAGATCGCGTCTGTTATGAGGAGAAGATACAAGTTTGTATAGAAAACGTTGAAAGAGCGATATTTATACACACACCTTAAAGATGAAAGTTGTAACCTTCGGTATTAAGAAAT
D L A A V Y R E E I N L C I K K A V E E S Y I H T T S N R D K L M S L W L E E H

```

CGAAATATTTCCTGCTGAAAAAGCTTCGCGGAAAAACAGTCTTGGGAGAAATTAAGCCAATAAGACCCCTCCTTCAAATATTGACTTGAGAGTTTCCATGCAAGCTCGAATGTAATT
9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200 9210 9220 9230 9240
CGCTTAAATAAGGACGACTTTTCGAAGCCCTTTGTGACGAACCCCTTAAATTCGGTTATTCTGGGAGGAGAAGTTATAACTGAACCTCAAAGGTACGTTGAGACTTACATTTAA
S I I G A S F A E R F V T K P S N L G I L G E E E F I S K L T K W A L E F T F E
CAAACCTCTGATTAGTCCATCCCTCAATAAATCATTGAATGGTCATATTTTCAAACCCCTTTTAAAGCTTGCTCAGAGCATTTTTGTAAATTTCAAATTTTGCCTATAATCGCTCA
9250 9260 9270 9280 9290 9300 9310 9320 9330 9340 9350 9360
GTTTGGAGACATAATCAGGTAGGGAGTTATTAGTAAACTTACCAGTATAAAAAGTTTGGGAGAAATTCGAACGAGTCTCGTAAAAACATTAAGTTTAAAAACGGATATTAGCGAGT
F R Q I L G D R L L D N S H D Y K E F G E K L K S L A N K Y N E F K Q R Y D S M
* L R E Y
<--- orf6

TATATAACAACCCCATCCCTATTATATTGAAATAAGCTTGCTATCATTCACATCGTTCAATAACAATATCGAATTTTAATAATGATTATATCTTCAATTTCACTAACAAAACCT
9370 9380 9390 9400 9410 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480
ATATATTGTTGGGTAGGGATAAAATAAACTTTATTCGAACGATAGTAAGTGTAGCAAGTATTATGTTATAGCTTAAAATTTACATAAAATATAGAAGTTAAAGTGATTGTTTGGGA
I V V G D R N I N S I L K S D N V D N M F V I D F K L L T N I D E I E S V F G G
CCCTCATTTGTGCAATCGAAGTCGAAAAATGTATATATAGCAATATCTATGTCGCTATTAACTTCTATTGTTCTCCTCTGCGCTAGATCCAAAAAGAACTATTTTTCTAATTTGGATATCTT
9490 9500 9510 9520 9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 9600
GGGAGTAAACAGCTTAGCTTACAGCTTTTACATATATATCGTTATAGATACACGGATAAATAGATAACAGAGGAGAACGGGATCTAGGTTTCTTGATAAAAAGATTAACTTATAGAA
E N N C D F D S F T Y I A I D I D S N I R N D G R A R S G F L V I K R I P Y R K
TTGGCGATGGCTTCCATATCTCTAATAATGTCATCACTTAAATGCAATTTGATTATATGCTTTTGTCTGATCATTCCAATAATCACCACCTCCGCTATCCAATTTTGTATTTTCCACAC
9610 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680 9690 9700 9710 9720
AACCGCTACCGAAGTATAGAGATTATTAACGTAGTGAATTTAACGTAAACTAATATACGAAAAACGACATAGTAAGGTTATTAGTGGTGAAGCGATAGGTTGATAAACATAAAAAGTGTG
A I A E M D R I I A D S L N C K I I H K Q Q I M G I I V V E A I W S N T N E C R
<--- orf5

CGCTTGATGTTTCATATTATACCACAAGGACTACTTTGAATAACATGGATGCCATCACCCAGCGTGGCTTCGTCTACTTCGTGCTGAAGGTAATGACCCATTCCTTGTGAGGTGCCGCA
9730 9740 9750 9760 9770 9780 9790 9800 9810 9820 9830 9840
GCGAACATACAAGTATAATATGGTGTCTCTGATGAACTTATTGTACCTACGGTAGTGGTTCGCACCCAGCAGATGAGCAGCGACTTCCATTACTGGGTAAAGGAACAGTCCACGGCGT
K Y T * I I G C P S S Q I V H I G D G L T A E D V E D S F T I V W E K D P A A S
CTGCTGCTTACTTTCGGGTATATCTTTCATACAGCGATTGCTCCGGCTTCTCCTCGGAAAGCCTTTCGTTTGCATGTCCGTGTACTACCTACCGCTTTTATAATGTTTGGAGGAATTC
9850 9860 9870 9880 9890 9900 9910 9920 9930 9940 9950
GACGACGAATGAAAGCCATATAGAGAAGTATGCTGCTAAGCAGGCCGAAAGAGGACGCTTTCCGAAAGCAACGTTACAGGCACATGTGATGGCGGAATATTACAACTCCTCTTAAG
S S V K P Y I E E Y L S E D P K E Q S L S E N A I D T Y V V A K I I N S S F E
<--- 'orf4

```

Abb. I.2: DNA-Sequenz der Genregion des *fdh*-Gensatzes II mit der sich stromabwärts anschließenden *slpB*-Region von *E. acidaminophilum*. In Bereichen, in denen die Gene komplementär transkribiert werden, sind beide Stränge gezeigt. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der einzelnen Gene sind unterhalb der DNA-Sequenz im Ein-Buchstabencode dargestellt. Stop-Codons sind mit * markiert. Potentielle Ribosomen-Bindestellen sind fett gedruckt. Mit <---> <--- sind potentielle Terminatorstrukturen gekennzeichnet. Nachgewiesene N-terminale Sequenzen von isolierten Proteinen sind doppelt, sowie potentiell am Aufbau von Eisen-Schwefel-Zentren beteiligte Cysteine einfach unterstrichen. *'orf4* und *orf5* sind als durchgängige Leserahmen dargestellt, die möglichen N-terminalen Aminosäuren von *orf5* sind hervorgehoben.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
 GAATTCTAACTGCAAGAGAATAATCCGATGGGTGTTGCTGCCACAAAATCATTATGGAAGCTATTAAACAAAGCTTTGACTGTAAGATAATTTTCAAGGAATATATCGGCAATTATAAA

orf11

130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
 GATAAACTCGCATGTACTACTTAGATTTCATGGACTTCAATGGCTTTGGCTTAAAGTGGTAAACATGGCACCCAAACATTTTATATCGATACTATGGAATCGAGTTTTCGGATTATAGCG
 M D F N G F G F K V V N M A P N I L Y R Y Y G I E F S D Y S A

250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 CCATAGATATCGCGCCGGATGTGCACACGATGCGGGTGTTCAAAGACTTGGCTGGACACCTTTTGTGACAGATCAGGAGATGGCACGATCTATACAAATTTGCAAGCAAGAGAGCTTA
 I D I A P D V H T M R V F Q R L G L T P F V T D Q E I A R I Y T I C K A R E L N

370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
 ATCCGGAGTTTCCGGGAATCGCGATGGCTTGGCTGGGAGGTGGAAAGTACTCTGTAAATCCCAAGTAAACCTAAATGCGGAGATGGCCCTTTAGCAGTTTCTGTGAACGAAAGATTG
 P E F P G I A D G L R W E V G K Y S C N P S K P K C G D C P F S S F C E R K I V

490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 TTTGAGCCGATGTTTGGGGTAAATATGCAATTGACTTGTCTCCAAATACCAACATTTTACAGTATATCATTTTGGCAAAACGCTTTAATATCAACGAAATCCGATTGACGTATCCCAAA
 *

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720
 AGAATTAGGTCAAAAAGTATAATACAAAACACAGAAAATCATGAAAATCCGATGTGAATAAAAAATTACCAAGACATTAATAAAAAACGGCTCGTCGCACGTTGAGACGGTAGTAT

730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840
 TGCTATCAAGGGTAGACAAGAGATAGATAAAGTAAATAGCGCTTCCGCTGATTGAGATCTGGCTCCAAGCTAGAAAAGATAGTCAAGGTTTTTTTATTTATGGGAACCTTAT

850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960
 CCAAGAATGCGAGAATGTAAGGTGAGTGGCTATATTGACTTTAGAGCTCGTGAGTTGATGAAATGCTGTCAAAAACGCTGCTGAGTTGATAAGATGACTATAAAAATTACAGATAAAAATG

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 GCAACAACCTAGAAAATGTTGTTATGTTTATTAATTCACAAAACGCTGAAATTAATATTGCGATCACTGAAATTTGATGATATCATAGATTAAGTCGTTGTTATAGTGAGGTGGCCAAA

orf10

1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 TTGCATGTTAGTTTAAAAAACCTTGGAAAGTGTGATTGATCGTGATGAAAAAGAAGTCTTTGTTTGTGGCCGGTATAAGTCAATCGCTCAATAGCAAAAACTAGGAAAGAAGCAAA
 M H V S Y K K L W K M L I D R D M K K K D L C L V A G I S H A S I A K L G K N E

meacI

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 AATATTACAAGTATGTTGCTTAGAATTTGTAAGCCTTGGATTGTGACATCGGTGATATTATGAAATAATAAAACGACGATAATGAGGGGCGACATATAATGAGTAATTCACCTGAA
 N I T T D V L L R I C K A L D C D I G D I M E I I N D D N E G A T Y I E *
 M R G R H I L S N S L K

1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 AATCAGCACTGAAAATGCAATCTAATAATACAGCAGCCCAATCTCAAGTGGCTGGTGGGAAAACACAGATGTAGAAGATATTATACCCAAGTGCCTACTAAATATGGGGCCTA
 I S T E N D N S N N T A R P I L K W A G G K T Q M L E D I I P K M P T K Y G R Y

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 TATTGAACCGTTTTTGGTGGCGGGCTGATTTTTTGGCTTAACTCTGAAGAGGCAATCATTCAGATAGTAATCCTGAGTTAATAAATCTATATACAGAAGTGGCCAAATATGTTCA
 I E P F F G G G A V F F A L N P E E A I I A D S N P E L I N L Y T E V A N N V Q

1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 AGCAATTTAAGTAACTTAAAAAATACGAGAATAACGAAGAATTTTTTATAATATGAGGGCTTTAGACTATAACTCAATTATCTTCAGTTGATGACGCTGCCAGACGATATATTGAA
 A I I S K L K K Y E N N E E F F Y N M R A L D Y N S L S S V D A A A R T I Y L N

1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 TAAGACGTGTTTCAATGGGCTTTAGAGTCAACAAAAAAGGACAGTTTAAATGTTCCCTTTGGAAGATATAAAAAATCCGAATATTTGATGGAAGAGCGTTGATGACGCTCAAATAT
 K T C F N G L Y R V N K K G Q F N V P F G R Y K N P N I C D E E A L Y A A S N M

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 GTTAAGACGGCTACGATGTTTGGCGGATTTTGGACATATTAACGAGCATGCAAAAAAAGATGATTAATCTTTTATAGATCCTCCATATTTACCTGTGFCGAGTACTCAGATTT
 L R R A T I V C G D Y L D I L N E H A K K D D L I F L D P P Y L P V S E Y S D F

1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 CAAAAGATACCAAGCAAGTATTTATGAAGAAGATCACATTGAAGTACTAAGAAGTCCAAAGTTCAGGAAATGGATGTCATGTTTCCCTACAAATCAAACCTCCCACTTGT
 K R Y T K E Q F Y E E D H I E A K E V Q R L Q E I G C H V I L T N S N H P L V

2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 ACATGACCTGTATGGTTCATTTAATATAGATGATATCAAAACAAAGAGATACATTTCAATGTAATGGTGGGAGAAAAGTGAAGATGTTATGTTAAACATTTCCACCTAAGAAAATAT
 H D L Y G S F N I D V Y Q T K R Y I S C N G S G R K G E D V I V N I P P K K N I

2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280
 TACTTTATCTTTGGTACCTGAACCCCTTACCAAGGCAAGTTGATAAATATCCAGCAACAAAGTTTCAATGGGCTCTAAGAGCAAACTATTAAACGAAATTTGGGATATTGCTTCTCAGTTTGA
 T L S L V P E P L P R Q V D K Y P A T R F M G S K S K L L T Q I W D I A S Q F E

2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 ATTTGAGAGTATGATGATTTGTTTCCGGTTCAGGAATGTAAGTTACATGTTTAAAGCACAAGGAAAACCTGATGTTAGCAATGACTACATGGAATGCGGCAACATTTACAAAAGC
 F E S V C D L F S G S G I V S Y M F K A Q G K T V V S N D Y M A M S A T F T K A

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520
 TATGATGAAAATAACTCAATACATATGCCCGAGATCGAAGCCGAAAAGCTTTAGTTAAATCAATGAGTCTGATGGTTTTGTTTCAAAAACATTTAAAGACCTTTACTTTACTGATTC
 M I E N N S I T L P E I E A E K L L V K S N E S D G F V S K T F K D L Y F T D S

2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640
 TGAGAATGATCTGATGATACGCTTCGGCTAAATATCTCAAAAATCAGAAGTCCATATAAAGAGCAATAGCAATGGCCGCTGATACGCTGTTGATTTAAAAAAGACCAAGAGGTAT
 E N D L I D T L R L N I S K I R S P Y K R A I A M A A L I R A C I K K R P R G I

2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760
 TTTTACATATACAGGTGATAGATATAATGATGGAAGAAAGGATTACCGAAAATCATTGGAAGAACAGTTTCTGGATGCTGTGAAAGATATAAATAATTCGATTTTCGATAATGGAAAAAA
 F T Y T G D R Y N D G R K D L R K S L E E Q F L D A V K D I N N S I F D N G K K

2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880
 GAACAATCAAAAATCTGATGCGATGAAACTACGATTAATAAACCAGATTTGGTGTATATTGATCCACCTTACTCTCCATATTCAGATAATGAGTATGTAAGATATACATTT
 N K S K N S D A M K L R I K K P D L V Y I D P P Y Y S P Y S D N E Y V R R Y H F

2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 TGTGAAGGATTAGCGAGAGATTGGAAGGAGGTAGAAAATCAAGAACACACTTAACAAGAAAATTTAAATCCTATCCAACTCCTTTCTCAACAAGAAAATGGTGGCGAGATGCTTTTGA
 V E G L A R D W K E V E I Q E H T L T K K F K S Y P T P F S T R N G A A D A F D

3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120
 TGTATTATCAAAAATGAAAGCAGCATAATAATTTGTCTATTTCTCAATGTTTACCAACATTAGATGAAAATGGTTTCTATCTTAAACATAAATCAACATGTTGAGTAAAT
 V L F K K Y E S S I I I V S Y S S N S L P T L D E M V S I L S K H K S H V E V I

reacI

3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240
 ACCTGTAGATTACCGATATTCATTTGGAATCAAGGACACAAGGTTGGAGATAACAACAATAAAGTTCAAGAGTATCTGTTTGTCCGATATTAAGGGGTGATATCGTGGCTATTGGTA
 P V D Y R Y S F G N Q G H K V G D N N N K V Q E Y L F V G Y *
 M A I W Y

```

3250      3260      3270      3280      3290      3300      3310      3320      3330      3340      3350      3360
TATTGGAAATACCTCAGTACGAAAGCGCATTTAGGTTGAGAGACGGTTTAGTCGCACATCATCTTCTCATTTACAGGGTAATATTGCTAAACAAAGAGGTGATCGAGCATTTCGAGATT
I G N T S V V R S A F R L R D G L V A L S S S H L Q G N I R K Q E G D R A F R D L
3370      3380      3390      3400      3410      3420      3430      3440      3450      3460      3470      3480
ACTTGGACAACATGGAATTTGTTCTTTAGGAACGGATGCTACAAATAGTGTGGCAGAAAGTGGAGATCAGCCCTTGGCAAACCTAGGGTTTTTGTATCCAGAAATCCCACGATCTTCAGA
L G Q H G I V S L G T D A T N S V G R K W R S A L G K L G F L Y P E I P R S S D
3490      3500      3510      3520      3530      3540      3550      3560      3570      3580      3590      3600
TATACGTCGAAGAAGATATAGGGCCCTTGGATACAATAACACCAAAATGGATGGCGATTAAATCAGATCAGAGACGGTTCTGCTATGCAAGGAGTGTTTTTGAGAGCTTTAGCTGCCCAATT
I R Q E D I G A L D T I T P N G W R L I R S E T V P A M Q E C F L R A L A A Q F
3610      3620      3630      3640      3650      3660      3670      3680      3690      3700      3710      3720
TATTGAAATTGAGGTATCAGGAGGCGAAAAAATATGGTTTTACCGTTGAGACATACTCTGGCAATTTTGTAGAAAATAGAGAGAAAAACTGGAGAGGCATCCATTAGCTTTATTGAAAT
I E I E V S G G E K I W F S P L R H T L A I L L E I E R K T G E A S I S F I E M
3730      3740      3750      3760      3770      3780      3790      3800      3810      3820      3830      3840
GGCTCTTTTCGTTCAAACTAGTAGTCCCGATGATAAAAACGCAATAACTGACAACATCTAAACTTTAGGAATGAGAGAAATGATGTAGAGTCAAGCGTAGATTTGATAATCTAAA
A L F V Q T T S S A D D K N A I T D N I L N F R N E R N D V E S K R R F D N L K
3850      3860      3870      3880      3890      3900      3910      3920      3930      3940      3950      3960
ATACAAGCAAAATGCTTATCTCATGTTTGAAGCGTCCACTTTCAGAGACTATGCAAAATTTAGATATTTAAAGCAACGGGACTGGTTCAAATAAGGGGAAAGGATAC
Y N E I A D L H S L K A S T F R D Y A D A N F R Y L K A T G L V Q N K G K G I A
3970      3980      3990      4000      4010      4020      4030      4040      4050      4060      4070      4080
GCTAGTTCATGAGAAACGATTTTTCTGAAATTAATGGCAAATGACACTCTGTCCCACTAGTGAAGTAGAGAGATATCGTTCAATGTGTAATGGGGCCAACTTCCAACTGATAGCCA
L V H E K R Y F S E L M A N D T S V P T S E L E R Y R S M C N G A N L P T D S Q
4090      4100      4110      4120      4130      4140      4150      4160      4170      4180      4190      4200
AGATCAGCATTGAAAGTCTACAAGATTTATTAGGCCAATTTATCCTCTATGGGAATACCATTGATTTAAAGAGGCAAAATCAACAGATACCTCGCAGATATAGCTATAATTAGACATGA
D A A F E V L Q D L L G Q L S S M G I P F D L R G K S T D T P A D I A I I R H E
4210      4220      4230      4240      4250      4260      4270      4280      4290      4300      4310      4320
GATTGAAGATTCATTTTAAAGTTAAAGAGAGATTTATGCGAGTGAACAAGCTGAACAATGGGAAGAGATAGCTGCTTACATAGACCTAATAGCATCCAGAAGAGAGAGAAAGAGAAT
I E D I I F K V K E E I Y A S E Q A E Q W E E I A A Y I D L I A S R R E R K R I
4330      4340      4350      4360      4370      4380      4390      4400      4410      4420      4430      4440
TGACGAGGAAACGAAATCGTGTATCCCTCGAAGTGAACGCCAGCATATCTAGAGTGGGTGTTGTGGCGAGCTTTTCTAGCAATTGACAGTTTGACAATAAACCTTATGAAGCAGGAAG
D E E T E I V I P R S E T P A Y L E W V L W R A F L A I D S L T N K P Y E A R R
4450      4460      4470      4480      4490      4500      4510      4520      4530      4540      4550      4560
ATTTAAAATGATCAGATTTTCTCCGGTGGGCACAGCTCCCGAAATGGTCCGGATCTAATTTATGGAATTCGAAAATTTTGTGATAGTTATTGAAAGTAACCTTACAGAAAATTCGAG
F K I D Q D F L P V G T A P G N G P D L I M E F E N F V I V I E V T L T E N S R
4570      4580      4590      4600      4610      4620      4630      4640      4650      4660      4670      4680
ACAAGAAGCTGCAGAAGGAGAGCTGTAAGACGTCTGTTGCTGATTTAATGAATCACTATACTGAAAAAATGGGAAGCCCGTCTATGGTTTATTGCGAATAATATTGACTCAAAA
Q E A A E G E P V R R H V A D L M N H Y T E K N G K P V Y G L F I A N N I D S N
4690      4700      4710      4720      4730      4740      4750      4760      4770      4780      4790      4800
CACAGCAGAGACGTTTGAATTTGGTACTCACGTAATGATGAGAAAATGAGTTTAAAGTATTATCCCAATAACAATCGCGCAGTTTAAATATTTTTTAGAGCTCTATTATTAA
T A E T F R I G V W Y S R N D E K M S L S I I P I T I A Q F N I F F R A L F I N
4810      4820      4830      4840      4850      4860      4870      4880      4890      4900      4910      4920
TAGTAGAGCGAATCCTCAAGAAGTCAATCTAATGAATGAGTGCAGAACAGCAGATAGATGTGAAGCTCCTGAGTGAAGAATATGATTAACAATACAGTTGAGAGTTTTGTTAG
S R A N P Q E V I N L M N E C E Q H R D R C E A P E W K N M I N N T V E S F V S
4930      4940      4950      4960      4970      4980      4990      5000      5010      5020      5030      5040
TAATATGTCAGTCTGCTGATTTGAATTAATTTTCCAAATAGATAAAACCCCTGCTCAATTTAAAGAGTAGGGTTTTTGTATGGATAAGAAAGCAAACGACAGATGTAAGGGGATAGTGA
N M S V C *
5050      5060      5070      5080      5090      5100      5110
CTTTTTTCATTTTCATAATTTTTCTTTATCTCGGACCGTTTGGATAATATCTTCAAGGTTACAGTCTAAAGCTT

```

Abb. I.3: DNA-Sequenz der Genregion des *eac*-Operons von *E. acidaminophilum*. Nur der *antisense*-Strang ist gezeigt. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der einzelnen Gene sind unterhalb der DNA-Sequenz im Ein-Buchstabencode dargestellt. Stop-Codons sind mit * markiert. Potentielle Ribosomen-Bindestellen sind fett gedruckt. Potentielle Terminatorstrukturen sind durch ---> <--- gekennzeichnet. Nachgewiesene N-terminale Sequenzen von isolierten Proteinen sind doppelt unterstrichen. Die potentiell am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren sind einfach unterstrichen.

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
GATCGGATTCCAGGGAGCAAAGTATGATAGTATCGATAAAGAGTATCTGGATTACATAAAATACATTGAAAAGATCCGTCTATTTTTAGAGAAAGAGTACGGCGGCAGTGCCCAAGAT
130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
CCGATTGTTCCAGAATGAATCCTACAGCAATAACACGCATGAAAAGAGCGAATGCTATAGGCTCTTCTTGTTTATTGTGTCCAGGGAGAGCAACAGGACGATGTTAAGTCTTTCTATGTT
250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
AGCTATGACTATTCTATCCATACAGATACAGGCACAGTCTACGAGAGCTTTGAGACATACAGACATAGACAAACTGTATATCTGCAATCTCCAGACGGTGAAGCAACATCAAGGTTTTT
370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
TAATAATTATTACTGAATCGCAATGAGATTTTGACGTGCGATGTCGAATAATAAATTGTTTATATTGATTAAGCAACAACCATGATGACAATTAAGTCTTCAATCATCAG
490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
CCAGAAGAAATTCACGGATGTTCCGGTCTTTATGCCGTCTCTGCTCATATCGAACTCATCATATGACACAACATACTTGGGGAAGTTATCCCTAATATTGTTAGGCCCAAAATTCAC
610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720
GCCGGATGGTCTCTCGGAAGCCTGGAGAAGAATTCAGTTTTCTCGGAGGCATTACTTCATACCACCTTTATATCGCAGGAAAATAAAATGATTGCATAATCTGTTTTGCGGTATATATG

      fdxA
730     740     750     760     770     780     790     800     810     820     830     840
CCATAGAAGAATATGGAGGTGTAATGAATGGCGTACAGAATTAACGATGACGAGTGCATAGCTTGTGGAGCATGCCAGCCGGTATGTCCAGTAGAGTGCATATCTGAAAAGAAGACG
      M A Y R I N D D E C I A C G A C Q P V C P V E C I S E K E D G
850     860     870     880     890     900     910     920     930     940     950     960
GAAAAAGACTTATCGACGAGGATAAGTGCATAAGCTGCGGAGCTTGTGCAGGTGTTTCCCGGTGAGCTGCATTTGAGAAGTATAATTTTTATAAGCAAAAATCAAGGGAGCTGGAGT
      K R L I D E D K C I S C G A C A G V C P V S C I S E V *
970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
CTTATTATAGACTCCGGCTTTCTTTTTTTAGCTTATTTTACCTGGAATTCGGGCATAATGGTTTACAAATGCTGTAATATGGCGTACGATATAAATAATGTTGTTGCAATCTGAAT
1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
GACTGTGATACTACCTTACAAGAAAAACGGAGCGTAAAAATATATGGAACATAAAGCAATGTCAAGGACACAGCTCTCATATTCGAAGTGGCGGGATGAGGGCAAGCTATACTGCGGGT
1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300    1310    1320
TTTTGAACAATCTCCTTGAAAATGAAATATACTCGACTATGTTGCCGGGATATCGGCAGGGCAAGCAGCGTCAATTATATTGCCCGGACACAGTGGGGCAAGAGTCTTTT
1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400    1410    1420    1430    1440
GTGGACCTTGTCTTGGAGCCGGATTTTGGCGGTGGAGGTCGTTTCTTAAGGGAGAGGGTTTCTTCCGCTCGCAGTACATATACGAGGAGACCCGCATATCCCGATGCGCCGCTGCCGCTT
1450    1460    1470    1480    1490    1500    1510    1520    1530    1540    1550
GATTTCATGCATTCATGGCTAATCCGCGCAAACCTTAGGATAGGGGCATTCGAGCGGAGCACTGGGGAGATGGTGTACTATTCCAAGGATGATATTCATACAATGCAGGATC

```

Abb. I.4: DNA-Sequenz der Genregion des Ferredoxins von *E. acidaminophilum*. Nur der *antisense*-Strang ist gezeigt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Ferredoxin-Gens ist unterhalb der DNA-Sequenz im Ein-Buchstabencode dargestellt. Das Stop-Codon sind mit * markiert. Die potentielle Ribosomen-Bindestelle ist fett gedruckt. Die potentiell am Aufbau der [4Fe-4S]-Zentren beteiligten Cysteine sind unterstrichen.

orf7

5' GAATTCAGTTTACTATACATCAGCCACAATATAGAAGCTTCAGATAATAAAATTAAGTCGGAATGGAAGCTCTTCTAAGATGGATTCTCCTGAAGAAGGTTTATTTCCAGCAGCTGCATTTTATA
E F K L Y Y Q P Q Y R T S D N K L V G M E A L L R W I H P E E G F I S P A D F I
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
CCTATAGCTGAAGAACTGGAATATATATTCAGTCTCGGCGAATGGGTAATTAATCAAGCAATGTGTCAAGCAAAAGCTTGAATCAAAAATAAATATGGATTTACAGGTTTGGTATTAAAT
P I A E E T G I I F S L G E W V I N Q A M C Q A K A W N Q K Y N M D L Q V G I N
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
ATTTCTCCACTTCAAATGAAAACCTCAGATTTTGTAAATAGGATAAGACAAAAATCCACGACGAAAGATATAAACCAAGATGGATAGATAGAAAATAACCCAGGTTGTAGCTATGAGC
I S P L Q I E N S D F V N R I R Q K I H D E D I K P E W I D I E I T E G V A M S
370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
TCTCAAGTTTCTATGGAAGAGATATTCTCGGCTTAGCAACATAGGAATAAGTATATCAATAGACGATTTTGGTACTGGATACTCATCTCTGAGCTATATTAAGAGATTTGATATCGAT
S Q V S M E E I F S G L A N I G I S I S I D D F G T G Y S S L S Y I K R F D I D
490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
AGACTTAAATAGCAAAAGAGCTAATGACAATATTGCTGAAGATAAAATACTGCTCATAGTAAAGCTATAATCATGATGGCTAGAGGAATGGGATTAATAACCAATAGCAGAAGGG
R L K I A K E L I D N I A E D K N T L L I V K A I I M M A R G M G L K T I A E G
610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720
GTAGAAGCTCAAATCACTAGAAATATTAAGTGCATAGATGCGATGAAATCAAGGCTATATATTTGGAAGACCTGTTCCACCAGAAATATTTGAGCTAGAGCATATAGATTAACCT
V E D S N Q L E I L K V L E C D E I Q G Y I F G R P V P P E I F E L E H I D *

Ende von fdhB

ATTCACCTTTCAAATTAACACAATCGAATATTGCTAAATTAATCCAAAATCTTATTGTTATTGAAAAAGGTCAGCTAAAATTTTATGCTGAACCTTTTATTATTATACCGTCTCTAA
730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840
TAAGTGAGAAGTTAATATGTTAGCTTATAACGATTAATTAAGGTTTTTGAATAACATAACTTTTTCCAGGTCGATTTAAAAATCGACTTGAATAATAAATATGGCAAGAATT
* V T R L

AGCATTGCTTTTCTTTATTTTACTTATTTCAATTTATATCTTTTGTCTACTAAGATAAAAAGCTTCAGCTGGGCATATCTCTACACATGCTGGTCCGCTTCTCTCTACACATAA
850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960
TCGTAACGAAAAGAAAATAAAATGAATAAAGTAAATATAGAAAACGAGATGATTTCTTTCGAAAGTCACCCGATAGAGATGTGACGACGAGCGGAAGAGAGGATGTGTATT
A N A K R K N K S I E N I D K Q E V L I F A E A P C I E V C A P G G E R G V C L
970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
GTCGCATTTATGGCTACATAGTTCCAAATTTGTTGTCGCTTAGCTTTGACTCTTTTTTCATGCTTCTTCATCAACCATATTCATTGCTCCAATGGGCAAGCTAAAATACA
CAGCGTAAAATACCGATGTTTCAAGGTTTAAACCAACACGCAATCGAACTGAGAAAAAAGTACCAACGAAGTAGTACTTGGTATAAGTAAACGAGTTATCCCGTTCCGATTTTATGT
D C K I A V M P A E L N T T D S L K S E C K K M T A E D H V M N M A G I P C A L I C
1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
AGTCTTACAGCCTATACACTGCTCAGTCTTTATTATTATTTCATCGTCTTGTATGATTATCCAGATACTGGGCATACATTGGCACATGGCGCATCTCCACATTGTCTACACTGAATAGG
TCAGAATGTCGGATATGACGAGTCAAGAAATAAATAAAGTAGCAGAACTACATAATAGGCTCTATGACCCGATGTAAACCGTGTACCCGCTAGGAGTGAACAGATGTACTTATCTT
T K C G I C Q E T K I I I E D D Q H I I G S V P C V N A C P A D E C Q R C Q I P
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320
AGTCGTAACATATCTGCTAATCAGATTTACTCTAGGTGAAAATGGTATCTGCTCTTATTGCTGTAACACGGATTTATCGATATGAGTACTGCGCATGTATCTCACAAGCCTT
TCAGCATGATATAGACGAGATAGTCTAAATGAGATCCACTTTACCATAGAGCAGGAATAAACGACATTGATGCTTAAATAGCTATCTCGATGACCGGTACCATAGAGTGTTCGGAA
T T V I D A R I L N V R P S F P I E D K N A T V V S K D I H A V A C A I E C A K

<-- fdhB **Ende von fdhA**

ACATCTTACATATTTTATAGGATTTGCTATACAAAAAGTATTCATCTATACTCCCTCCCTTTACTATCTACACTGCATTTTGAGTTCTTTTTTAAAGATTTTCTTTTTTGACATCC
1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
TGATAGATGTAAAAAATCCTAACAGATTTGTTTTTATAAGTAGATATGAGGGAGGAAATGATAGGATGTGACGATAAAATCAAAAGAAAATTTCTAAAAAGAAAATCGTAGG
C G I C K K P N A I V F T N M * * V A N Q T E K K F I K R K Q C G

AAAATCAGAAAACTAGTTTTTTTACATTAAGTACGACACCTTGTACTCAGGAGTTTGTGTATAGGATCTCGGCACATTTTGTCAAAAATATTACCTGGATTTTTCAGTAAAGTGGAA
1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560
TTTTAGCTTTTTTATAGTCAAAAATTAATGACTCGTGTGGAACATGAGTCTCAAAACACATCTCTGACGCGGTGATAAACAGTTTTTATAATGGACCTAAAGATCATTACCTT
F S F D L K K V N V S C V K Y E P T C I P D A A S N T L I N G P E E T F H C
1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
AGTAATAAAGTCAAGCCTTCTGTTACTCTGTTGTAACCTGAGCTTTAGTTATAAGTGAACCTCTCGAGTTGTTACAGATACCTCATCTCCATCTTCTATGTTAAGTTTCGACGATC
TCATTATTTTCAAGTTCGGAAGACCATGAGACCAACTGAACTCGAAATCAATATTCATCTGGAGAGCTCAACAATGCTCTATGGAGTAGAGTGAAGATACAATAATCAAGCGTCGTAG
T I F T L G E P V R T T V Q A K T I L S G R R T T V S V E D G D E I N L N A A D
1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
TACAGGATTTTCTATAGATTCCTCGGATGAGTCCATTAAGTCCCAGCAGCCCTGTGATAGTCCAGTATGATAATGAGCCACTACCCTCCAGTAGTAAAGCATAAGTGGATA
ATGCTCAATAAAGATATCTAAGSAGACTACTCAGGTAATTCAGGGCTGCTCGGCAACAGTATCAAGGTCACTACTATTACTCGTGTATGGGAAGGTCATCTTCGATTCACCTAT
V P N I E I S E E P H T G N L G W C R R T M T G G T H Y H A V V R G T T L M L P Y

CTCTTTATCAGGCATTTTCAGCTGGTCTCTATGTTCTATTGTCAGAAAACTTCCATACTCTAGAAAATTTCCCTATGTTGTAATATCGGTGTTCTTTATGTTCTTTCAGTAGGACATGG
1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920
GAGAATAGTCCGTAAGTTCGACCCAGAGATACAAGATAACGCTTTTTGAAAGGATTAGGAGATCTTTTAAAGGGATACACATTAAGCCACAAGAAATACCAAGATCATCTTCGTACC
E K D A P M E A D R H E I A S F K G L R G S F K G I H L I P C G K H D E T P C P C
1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040
CCAAGAAATGACTTCAATTTCTATTCTGCATACGTAATTCCTGCATAGTAGGAGTTACAGTCTTATTTCATTGAATATTTCTTCAGGAGATTATAATCGTAGGATATCCATAGA
GGTTCTTTACTGAAAGTAAAGATAAGACGGTATGCATTAAAGGACGTATCGATCTCAATGTCAAGAATAAAGTAACTTATAAAGAAAGTCCCTCAAAATATTAGCGATCCATAAGGTATCT
W S I V E N E I R G Y T I G A Y S P T V T R I E N F I E E P S K Y D S P Y E M S

AGAATCAGCTTGTGATGATCAACAGTCAAGCATAGAGTTTCCCTATAGGCTCAACTGCCTTTCTTATTCTTGAAGTCTTCTGTTCCACTAAAGGTTCCATCTTTTCTGCAAA
2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160
TCTTTAGTCAAGCAGTATAGTTGGTCAAGTCCGATCTCAAAGGATATCCGAGTGAACGGAAGAATAAAGAACTTGAAGAGACAGCAAGGATTTCCAAGTAGAAAAGACGTTT
S I L K S L I L W D P M S N G I P E V A K R I R Q V R R D T G S F T G D K E A F
2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280
GCTTGTCTGGTACTACATCTGCAAGCTCAGCTGTCTCAGTCAAAAATATATCTGGAGATAAGGCAGTCAAGATGCTCTAAGCAATGCTTTACATGAGTAACTCTGGATCACT
C G A G P L V D A L E A T A G T L F I D Q V I L C D L H E L C H K V H T V D P D S
2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
TCTAATCGGTTTTCTCCAATACATATAAAAACCTTCAATATCTTTCATTATTTCATTAAGAAGTACGGAATAGTAAGCCCAACTTTTACGTAAGTGGCTTATCCACGCTTTTTT
AGATTGACCCAAAAGGTTTATGATATTTTGGAAAGTGAATAGAAAGTAAATAAGTAACTTCTGACTGCCTTATCATTCCGGTTGAAATAGCGAATACCGAATAAGTGGCAAAAAG
R V P N E G F V Y L V K V N D K M I E N L V S P I T L G V K D S L P K N W A K E

AAATTTCTTTTATTGCTGGTCCGTAAGTCTGATATCTGGATAAACGTTAGGAAGAGCTCCCATATCACAAGCCCTTGAAGCTTTGTTTGTCTCTAAGTGGGTTTACTCCAGC
2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520
TTTAAAAGAAAATAACGACCCAGGCTTACGAACTATAGGACCTATTTGCAATCTCTCGAGGATAGTGTTCGGGGAACTTGAACAAAACAGGAGATTACCCAAATGAGGTCG
F K E K I A P C D T V A Q Y G P Y V N P L A G M D C A G Q V N N Q Q V N V G A
2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640
TTTTGGCTTTCCAAGATTTCCAGTAAACATAGCTAGATTTGCAACAGAAAGCAATGCTCTACTCTGTAGTATGCTGTGATTTCCCATAGTGTAGTGAAGCAGTATGTTTGGATTT
AAAACCGAAAGTTCTAAAGGTCATTGGTATCGATCTAAACGTTGCTTTCTGTAAACAGATGAGGACATCATACGACACTAAGGATCATCATCTCTCGTCAATAACAACTAAA
K P K G L N G T V M A L N A V S L V N D V G T H Q T I G M T Y Y S A T N N S K


```

                                orf8
5650      5660      5670      5680      5690      5700      5710      5720      5730      5740      5750      5760
TTAACAGATGTTAATACAGGAGGCAAATGATGGAAACTCAAATAAAACAATAGAATAAGAGGTTTTTACAACTTGATGCCTTTTTAAAAAGAAATTTGAACCATGCCTGTATT
M M E N S N K T I E L R G F L Q L D A F L K K K F G T M P V F

5770      5780      5790      5800      5810      5820      5830      5840      5850      5860      5870      5880
CTCGAAATCGATGGCCCTATAAGCGGTTTGGAACTCTTAAACAGCTAGAAATCAAGCGAGACGATATCGAAGTAATTTTTGTAAACGGTTTTGTTTCAGCAGGTAGATTATAATCAAT
L E I D G P I S G L E L S K Q L E I K R D D I E V I F V N G F V Q Q V D Y I I N

5890      5900      5910      5920      5930      5940      5950      5960      5970      5980      5990      6000
CCTGGAGACCGCGTAGCTTTTCTGCCACCTGGATGTCCTGGCCCTTATAGGATTGCTTTAGGCTTTTATGGAAAAATCAAGGCAATGAAGCAAATTTAAACTCAAGAAAGACACCTAG
P G D R V A F L P P G C P G P Y R I A L G F Y G K N Q G N E A N F K L K K D T *

                                orf9'
6010      6020      6030      6040      6050      6060      6070      6080      6090      6100      6110      6120
ATATGATTTAGGAGGAAATATGCAATCACTGTTAAGCTCTTTGCAAACCTAAGAGAAAATAGAGAAAAATAATGGATATGGACGTAAGTTTCAGATACTACTGTCAAAGAAATAATTG
M Q I T V K L F A N L R E N R E K I M D M D V S S D T T V K E I I E

6130
AAAGCCTCGGAATTC 3'
S L G I

```

Abb. II.1: DNA-Sequenz der Genregion des *fdh*-Operons sowie des *aor/car*-Operons von *C. sticklandii*. In Bereichen, in denen die Gene komplementär transkribiert werden, sind beide Stränge gezeigt. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der einzelnen Gene sind unterhalb der DNA-Sequenz im Ein-Buchstabencode dargestellt. Stop-Codons sind mit * markiert. Potentielle Ribosomen-Bindestellen sind fett gedruckt. Potentiell am Aufbau von Eisen-Schwefel-Zentren beteiligte Cysteine sind einfach unterstrichen.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. J. R. Andreesen dafür, dass er mir dieses spannende Thema anvertraut und die Arbeit mit motivierender Unterstützung, konstruktiven Diskussionen und ständigem Interesse begleitet hat.

Herzlich danken möchte ich auch Dr. Andreas Pich für viele konstruktive und kritische Diskussionen, seine stete Gesprächsbereitschaft und für die Durchsicht des Manuskriptes, sowie für das Ignorieren meiner Launen und für das ab und zu notwendige „auf-den-rechten-Weg-Zurückbringen“.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Ute für ihre tatkräftige Unterstützung bei zahlreichen Experimenten, sowie für die vielen vielen Sequenzierungen am ABI.

Einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit durch ihre gute Zusammenarbeit und das lockere Arbeitsklima haben alle gegenwärtigen und ehemaligen Mitglieder der Labore 308 und 311 geleistet, insbesondere Kathrin, David, Burghard und Brit.

Bei Ede möchte ich mich für die immerwährende Hilfsbereitschaft nicht nur bei Fragen rund um den Computer bedanken.

Herrn Dr. K. P. Rücknagel danke ich für die Ausführung der N-terminalen Sequenzierungen, Grit Schleuder für die Zusammenarbeit bei der Analyse der *primer extension* am ALF, Dr. D. Alber für die Durchführung der Elementanalyse und Prof. Dr. F. Mayer für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Prof. Dr. P. Dürre danke ich für die Ermöglichung eines Gastaufenthaltes an seinem Institut.

Auch möchte ich allen Institutsangehörigen und anderen Personen, die mir mit Rat und Tat behilflich waren, danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre vielfältige Unterstützung, ihr Vertrauen und ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), den 30.10.2000

Andrea Gräntzdörffer

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Andrea Gräntzdörffer
Geburtstag: 27.04.1973
Geburtsort: Lüneburg

Schulausbildung:

1979 - 1983 Besuch der Grundschule in Lüneburg
1983 - 1985 Besuch der Orientierungsstufe in Lüneburg
1985 - 1992 Besuch des Gymnasiums „Herderschule“ in Lüneburg
6/1992 Allgemeine Hochschulreife

Studium:

9/1992 Immatrikulation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Studienfach Biochemie/Biotechnologie (Diplom)
8/1994 Vordiplomprüfung in den Fächern Biochemie, Allgemeine und Anorganische Chemie, Physikalische Chemie, Organische Chemie, Naturstoffchemie, Allgemeine Biologie und Physik
9/1996 Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Enzymologie, Organische Chemie, Immunologie und Mikrobiologie
10/1996 – 7/1997 Experimentelle Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. J. R. Andreesen am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg („Molekularbiologische Analyse von Genen der Glycin-Reduktase und des Thioredoxin-Systems aus *Clostridium sticklandii*“)
seit 10/1997 Anfertigung der Dissertation im Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg unter Anleitung von Prof. Dr. J. R. Andreesen