

**Charakterisierung und Kristallisation der Elektronen-
einspeisenden
Module der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Kai Hofmann
aus Ziegenhain

Göttingen 2003

D7

Referent:

Priv. Doz. Dr. U. Deppenmeier

Korreferent:

Prof. Dr. G. Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung:

6. November 2003

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	5
2.1 Organismen und Plasmide	5
2.2 Nährmedien, Puffer und Stammlösungen	9
2.2.1 Medien für <i>E. coli</i>	9
2.2.1.1 LB (Luria-Bertani)-Medium (SAMBROOK et al., 1989)	9
2.2.1.2 SOB-Medium (HANAHAN, 1983)	10
2.2.1.3 SOC-Medium	10
2.2.1.4 MI -Medium (MOTT et al., 1985, modifiziert)	11
2.2.2 Medium für <i>Ms. mazei</i> Gö1 und <i>Ms. acetivorans</i>	12
2.2.2.1 Vitaminlösung (WOLIN et al., 1964, modifiziert)	13
2.2.2.2 Spurenelementlösung (PFENNIG und LIPPERT, 1966)	14
2.2.3 Medium für <i>A. fulgidus</i>	14
2.2.3.1 Mineralienelexier nach Wolfe	15
2.2.4 Titan-(III)-Citrat-Lösung	16
2.2.5 Pufferlösungen	16
2.2.5.1 Waschpuffer für anaerobes Arbeiten	16
2.2.5.2 Tris-NaCl-Puffer	16
2.2.6 Medienzusätze	16
2.3 Zellanzucht	17
2.3.2 Anzucht von <i>E. coli</i>	17
2.3.2.1 Anzucht für Plasmidpräparationen	17
2.3.2.2 Anzucht im 10 Liter-Maßstab	17
2.3.3 Messung der optischen Dichte	18
2.3.4 Ermittlung von Wachstumsparametern	18
2.3.5 Bestimmung des pH-Wertes	18
2.3.6 Stammhaltung	19
2.3.7 Reinheitskontrollen	19
2.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	19
2.4.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	19
2.4.2 Isolierung von chromosomaler DNA	19
2.4.2.1 Isolierung chromosomaler DNA mit CTAB	19
2.4.2.2 Isolierung genomischer DNA mit dem AquaPure®-Kit	20
2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA	21
2.4.3.1 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA	21
2.4.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse	22
2.4.4 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	23
2.4.4.1 Phenol/Chloroform-Extraktion	23

2.4.4.2	Fällung von Nukleinsäuren	23
2.4.4.3	Mikrodialyse von Nukleinsäuren	23
2.4.4.4	Reinigung von DNA durch Absorption an Glasmilch	23
2.4.4.5	Reinigung von PCR-Produkten	24
2.4.4.6	Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von DNA	24
2.4.5	Auftrennung von DNA-Fragmenten	25
2.4.5.1	Agarosegelelektrophorese	25
2.4.5.2	Größenbestimmung von Nukleinsäuren	26
2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.6	Enzymatische Modifikation von DNA	29
2.6.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	29
2.6.2	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	29
2.6.3	Herstellung von glatten Enden	30
2.6.4	Ligation von DNA-Fragmenten	31
2.7	Übertragung von DNA in <i>E. coli</i> durch Transformation	31
2.7.1	Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation	31
2.7.2.	Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation	32
2.7.3	Transformation durch Hitzeschock	33
2.7.4	Transformation durch Elektroporation	33
2.7.5	Blau-Weiß-Test	34
2.8	Sequenzierung von DNA	34
2.8.1	Analyse der Sequenzdaten	34
2.9	Arbeiten mit Proteinen	35
2.9.1	Einengen und Entsalzen von Proteinlösungen	35
2.9.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	35
2.9.3	Bestimmung der Molekularmassen von Proteinen	36
2.9.4	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von Proteinen	36
2.9.5	Native Gradienten-PAGE	39
2.9.6	Silberfärbung (BLUM et al., 1987)	41
2.9.7	Coomassie-Färbung (Weber und Osborn, 1969, mod.)	42
2.10	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	43
2.10.1	Heterologe Expression mit dem pET-System	43
2.10.2	Heterologe Expression mit dem Strep-Tag-System	44
2.11	Zellernte und Zellaufschluß	44
2.11.1	Zellaufschluß mit der French Pressure Cell	44
2.11.2	Zellaufschluß durch Ultraschall	45
2.12	Reinigung von Proteinen	45
2.12.1	Hitzefällung	45
2.12.2	Chromatographie an Strep-Tactin	45
2.12.3	Affinitätschromatographie an Hydroxylapatit	46
2.12.4	Größenausschluß-Chromatographie mit Superdex 200®	46
2.12.5	Molekularmassenbestimmung von Proteinen mit der Größenausschluß-Chromatographie	47

2.13	Reinigung von F ₄₂₀	47
2.14	Optisch-enzymatische Aktivitätsbestimmungen	48
2.14.1	Reduktion des F ₄₂₀	48
2.14.2	Bestimmung der F ₄₂₀ H ₂ -Dehydrogenase-Aktivität	49
2.15	Spektralphotometrische Untersuchungen	49
2.15.1	Dioden-Array-Photometer	49
2.15.2	Aufnahme von UV-Vis-Spektren	50
2.15.3	UV-Vis spektroskopische Konzentrationsbestimmung von FAD	50
2.15.4	Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen	50
2.15.5	Bestimmung von säurelabilem Schwefel	51
2.16	EPR-Spektroskopie	52
2.17	Kristallisationsexperimente	54
2.18	Gelretardation von DNA-Protein-Komplexen	56
2.18.1	In der nicht-denaturierenden PAGE	56
2.18.2	In Agarosegelen	57
2.19	Chemikalien, Biochemikalien und Gase	58
3.	Experimente und Ergebnisse	61
3.1	Klonierung	63
3.1.1	Klonierung des Gens <i>fqoF</i> der F ₄₂₀ H ₂ -Chinon-Oxidoreduktase aus <i>A. fulgidus</i> in <i>E. coli</i>	64
3.1.1.1	Amplifizierung des Gens <i>fqoF</i> der F ₄₂₀ H ₂ -Chinon-Oxidoreduktase aus <i>A. fulgidus</i> mittels PCR	64
3.1.1.2	Klonierung und Sequenzierung des Gens <i>fqoF</i> in pMPMT3	65
3.1.1.3.	Umklonierung des Gens <i>fqoF</i> von pKH4 in pET-21c	66
3.1.1.4	Klonierung des Gens <i>fqoF</i> der F ₄₂₀ H ₂ -Chinon-Oxidoreduktase aus <i>A. fulgidus</i> in den Überexpressionsvektor pASK-IBA5	69
3.1.1.5	Amplifizierung des Gens <i>fqoF</i> der F ₄₂₀ H ₂ -Chinon-Oxidoreduktase aus <i>A. fulgidus</i> mittels PCR zur Klonierung in pASK-IBA5	69
3.1.1.6	Klonierung und Sequenzierung des Gens <i>fqoF</i> mit eingefügten <i>BsaI</i> Schnittstellen in pMPMT3	70
3.1.1.7	Umklonierung des Gens <i>fqoF</i> aus pMPM-T3 in pASK-IBA5	71
3.1.2	Klonierung und Sequenzierung des Gens <i>fpoF</i> aus <i>Methanosarcina acetivorans</i> in den Überexpressionsvektor pASK-IBA5	74
3.1.2.1	Amplifizierung des Gens <i>fpoF</i> der F ₄₂₀ H ₂ -Phenazin-Oxidoreduktase aus <i>Methanosarcina acetivorans</i> mittels PCR	74
3.1.2.2	Klonierung und Sequenzierung des Gens <i>fpoF</i> in pZErO-2	75
3.1.2.3	Umklonierung des <i>fpoF</i> -Gens von pZErO in pASK-IBA5	76

3.1.3	Klonierung des Gens <i>fpoO</i> der F ₄₂₀ H ₂ -Phenazin-Oxidoreduktase aus <i>Methanosarcina mazei</i> in <i>E. coli</i>	78
3.1.3.1	Amplifizierung des Gens <i>fpoO</i> mittels PCR	78
3.1.3.2	Klonierung und Sequenzierung des Gens <i>fpoO</i> in pASK-IBA3	79
3.2	Überproduktion und Aufreinigung von Untereinheiten der F ₄₂₀ H ₂ -Dehydrogenase	81
3.2.1	Überproduktion des FqoF Proteins in dem <i>E. coli</i> -Stamm BL21(DE3)	81
3.2.1.1	Heterologe Expression des Gens <i>fqoF</i> in <i>E. coli</i> BL21(DE3) und Aufreinigung des FqoF Proteins mittels des pET-Systems	83
3.2.1.1.1	Anreicherung des FqoF Proteins durch Hitzefällung	83
3.2.1.1.2	Chromatographie an Hydroxylapatit	83
3.2.1.1.3	Gelfiltration mit Superdex 200®	85
3.2.1.1.4	SDS-PAGE-Analyse des FqoF Proteins unter verschiedenen Denaturierungsbedingungen	87
3.2.1.1.5	Ermittlung der molekularen Masse des nativen FqoF Proteins	89
3.2.1.1.6	Aufreinigungsprotokoll des FqoF Proteins	91
3.2.1.2	Überexpression und Aufreinigung des FqoF Proteins mit dem IBA Strep-Tag System	92
3.2.1.2.1	Affinitäts-Chromatographie des FqoF Proteins an Strep-Tactin	93
3.2.1.2.2	Gelfiltration mit Superdex 200® XK26/90	94
3.2.1.2.3	Bestimmung der molekularen Masse des nativen FqoF Proteins mit Strep-Tag	96
3.2.1.2.4	Aufreinigungsprotokoll des FqoF Proteins mit Strep-Tag	97
3.2.2	Überexpression und Aufreinigung des FpoF Proteins aus <i>Ms. acetivorans</i> mittels des Strep-Tag-Systems	98
3.2.2.1	Heterologe Überexpression des FpoF Proteins in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	98
3.2.2.2	Affinitäts-Chromatographie an Strep-Tactin mit dem FpoF Protein	99
3.2.2.3	Gelfiltration mit Superdex 200® XK26/90	101
3.2.2.4	Zusammenfassung der Reinigung des FpoF Proteins	103
3.2.3	Überexpression und Aufreinigung des FpoO Proteins aus <i>Ms. mazei</i> Gö1 mittels des Strep-Tag-Systems	104
3.2.3.1	Heterologe Überexpression des FpoO Proteins in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	104
3.2.3.2	Affinitäts-Chromatographie an Strep-Tactin mit dem FpoO Protein	105
3.2.3.3	Überproduktion und Aufreinigung des FpoO Protein unter anaeroben Bedingungen	107
3.2.4	Vergleich der aufgereinigten Untereinheiten	107

3.3	Charakterisierung der überproduzierten Untereinheiten der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen	109
3.3.1	Analyse der Eisen-Schwefel-Zentren der aufgereinigten Untereinheiten	109
3.3.1.1	Bestimmung des Nicht-Häm-Eisen-Gehalt	109
3.3.1.2	Bestimmung des säurelabilen Schwefels	110
3.3.2	Bestimmung des Flavingehalts in den Proteinen FqoF und FpoF	111
3.3.2.1	UV-Vis spektroskopische Konzentrationsbestimmung von FAD	111
3.3.3	UV-Vis Spektren der überproduzierten Proteine FqoF und FpoF	112
3.3.3.1	UV-Vis Redox-Spektrum des FqoF-Proteins	113
3.3.3.2	UV-Vis Redox-Spektrum des FpoF-Proteins	116
3.3.3.3	UV-Vis Redox-Spektren des FpoO-Proteins	119
3.3.4	EPR-Spektren des Inputmoduls der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase	120
3.3.4.1	EPR-Spektrum des Fqo F Proteins	121
3.3.4.2	EPR-Spektrum des Fpo F Proteins	124
3.3.5	EPR-Spektrum des FpoO Proteins	126
3.3.6	DNA-Bindestudien mit dem FpoO Protein	128
3.4	Kristallisation der Inputmodule der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen aus <i>A. fulgidus</i> und <i>Ms. acetivorans</i>	130
3.4.1	Kristallisation des FqoF Proteins	134
3.4.2	Kristallisation des FpoF Proteins	136
3.4.3	Kristallisation des FpoO Proteins	138
3.5	Röntgenstrukturanalyse der Kristalle des FqoF und des FpoF Proteins	138
4.	Diskussion	139
4.1	Bedeutung der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase im archaellen Stoffwechsel	139
4.1.1	Energiekonservierung von <i>A. fulgidus</i> bei Wachstum auf Laktat und Sulfat	140
4.1.2	Funktion der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase während der Methanogenese	142
4.1.3	Protonentranslokation in methanogenen Archaea	147
4.1.4	Die Komponenten der Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systeme	147
4.1.4.1	Die F_{420} -nichtreduzierende Hydrogenase	149
4.1.4.2	Die Heterodisulfid-Reduktase	151
4.1.4.3	Die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase	152

4.2	Die F ₄₂₀ H ₂ -Dehydrogenase und die NADH:Chinon-Oxidoreduktase im Vergleich	156
4.2.1	Das Inputmodul	159
4.2.1.1	Die Flavine der Inputmodule	160
4.2.1.2	Die Eisen-Schwefel-Zentren der Inputmodule	162
4.2.2	Das membranassoziierte Modul	166
4.2.2.1	Die FpoO Untereinheit aus <i>Ms.mazei</i> Gö1	169
4.2.3	Das membranintegrale Modul	170
4.3	Betrachtungen zur Überproduktion und Aufreinigung von Untereinheiten des Komplex I und der F ₄₂₀ H ₂ -Dehydrogenase	172
4.4	3D-Modelle des Komplex I / NDH I	176
4.4	Kristallisation der Inputmodule FqoF/FpoF der F ₄₂₀ H ₂ -Dehydrogenase	178
4.6	Der Reaktionsmechanismus des Komplex I und der F ₄₂₀ H ₂ -Dehydrogenase	178
4.6.1	Betrachtungen zum Reaktionsmechanismus der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase	179
4.6.2	Betrachtungen zum möglichen Reaktionsmechanismus der F ₄₂₀ H ₂ -Dehydrogenase	182
4.7	Die medizinische Bedeutung des Komplex I	185
5.	Zusammenfassung	189
6.	Literaturverzeichnis	192
7.	Anhang	222

Abkürzungsverzeichnis

<i>A.</i>	<i>Archaeoglobus</i>
Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp ^r	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP-Synthase
β	$9,274096 \cdot 10^{-24} \text{ J T}^{-1}$ (Bohr Magneton)
bp	Basenpaare
Bicine	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine
BSA	Rinderserumalbumin
c-	centi
ca.	circa
CH ₄	Methan
CoM-S-S-CoB	gemischtes Disulfid aus HS-CoM und HS-CoB
Cyt.	Cytochrom
d-Desthiobiotin	5-Methyl-2-oxo-4-imidazolincapronsäure
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTT	1,4-Dithio-L-threitol
$\Delta\mu\text{H}^+$	Transmembraner elektrochemischer Protonengradient
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
E	Extinktion
ε	Extinktionskoeffizient
e ⁻	Elektron
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	paramagnetische Elektronenresonanz
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
F ₄₂₀	(N-L-Lactyl- γ -L-Glutamyl)-L-Glutaminsäure-Phosphodiester des 7,8-Didemethyl-8-Hydroxy-5-Desazariboflavin-5'-Phosphat
F ₄₃₀	Hydrophorphinoid-Nickel-Komplex (Komponente der Methyl-CoM-Reduktase)
Fa.	Firma
FAD	Flavin-Adenin Dinukleotid
FMN	Flavin Mononukleotid
g	Gramm
g-Wert	$g = hv/\beta H$
$\Delta G^{\circ'}$	freie Reaktionsenthalpie unter Standardbedingungen bei pH 7
h	Stunde
<i>h</i>	$6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$ (Planck Konstante)
H	Magnetfeld in T
H ₂ O _{bidest.}	zweifach destilliertes Wasser
H ₂ O _{demin.}	demineralisiertes Wasser
H ₄ MPT	Tetrahydromethanopterin

HABA	4-Hydroxyazobenzen-2-Carboxylsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethanesulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS-CoM	2-Mercaptoethansulfonat
HS-CoB	7-Mercaptoheptanoylthreoninphosphat
Hz	Hertz
K_{av}	Verteilungskoeffizienten
k-	Kilo
K	Kelvin
Kan^r	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaare
KP	Kaliumphosphat
log	Logarithmus (dekadisch)
M	molar
m	Meter
M	Mega
MeOH	Methanol
μ -	mikro
m-	milli
m/Z	Verhältnis von Masse zur Ladung
MCS	multiple-cloning-site
MES	2-Morpholinoethanesulfonsäure
MF	Methanofuran
min	Minute
<i>Ml.</i>	<i>Methanlobus</i>
MOPS	γ -Morpholinopropansulfonsäure
MPa	Megapascal (entspricht 10 bar)
MPD	2-Methyl-2,4-Pentandiol
MQ	Menachinon
mS	mili-Simens
<i>Ms.</i>	<i>Methanosarcina</i>
MT	Methyltransferase
MTZ	Metronidazol
MV	Methylviologen
MW	Molekulargewicht
ν	Mikrowellenfrequenz in s^{-1}
n-	nano
NAD(P)	Nicotin-Adenin Dinucleotid (Phosphat)
$^{\circ}C$	Grad Celsius
OH-	Hydroxy-
OD	Optische Dichte
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PNK	Polynukleotidkinase
ppm	Parts per million
PQ	Plastochinon
Q	Chinon
RBS	Ribosomenbindestelle
RF	relative Mobilität

RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
S	Svedberg
s	Sekunde
SD	Shine-Dalgarno-Sequenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Spurenelemente-Lösung
Strep-Tag	Streptavidin-Binde-Protein
Tab.	Tabelle
T	Tesla
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet ^f	Tetracyclinresistenz
Tris	Tris (Hydroxymethyl) Aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
U	Unit, Enzymeinheit (1 U = 1 µmol Substrat/min)
UE	Untereinheit
UQ	Ubichinon
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
V _e	Elutionsvolumen
Vis	sichtbar (visible)
V _{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
V _O	Ausschlußvolumen
V _t	Gesamtvolumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	-fache Erdbeschleunigung

Einbuchstabencode für Aminosäuren

A	Alanin	C	Cystein	D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure	F	Phenylalanin	G	Glycin
H	Histidin	I	Isoleucin	K	Lysin
L	Leucin	M	Methionin	N	Asparagin
P	Prolin	Q	Glutamin	R	Arginin
S	Serin	T	Threonin	V	Valin
W	Tryptophan	Y	Tyrosin		

1. Einleitung

Analysen der 16S rRNA führten zur Einteilung aller lebenden Organismen der Erde in die drei Domänen der *Eukarya*, der *Bacteria* und der *Archaea* (WOESE et al., 1990, OLSEN und WOESE, 1993). Die Domäne der *Archaea* ist wiederum in drei Reiche aufgeteilt, das der Crenarchaeota (thermophile Vertreter), der Euryarchaeota (extrem halophile, sulfatreduzierende und methanogene Organismen) und der Korarchaeota (WOESE et al., 1990). Von der dritten Gruppe, den Korarchaeota, sind bisher nur rRNA-Gene sequenziert worden (BROWN und DOOLITTLE, 1997). Die entsprechenden Organismen ließen sich bislang nicht im Labor kultivieren. Erst kürzlich wurde über die sogenannten Nanoarchaeota, als eine vierte Gruppe berichtet. Von diesen Vertretern konnte bis dato nur *Nanoarchaeum equitans*, ein symbiotisch lebendes Archaeon mit einem Genom von nur 0,5 Mb, isoliert werden (HUBER et al., 2002).

Die Archaeen unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch physiologisch von den Bakterien. Im Gegensatz zu der letztgenannten Gruppe besitzen archaeele Organismen anstelle einer β -1,4-glykosidischen N-Acetyl-Mureinsäure/N-Acetyl-Glucosamin-Verknüpfung eine Pseudomureinschicht, bei der N-Acetyl-Glucosamin β -1,3-glykosidisch mit Talosaminmuronsäure verknüpft ist (KANDLER und KÖNIG, 1978). Die Zellwände der *Archaea* sind daher gegen Lysozym und Penicillin resistent. Auch hinsichtlich der Cytoplasmamembran sind Besonderheiten zu nennen. So sind in den Membranen der *Archaea* Phospholipide, Sulfolipide, Glycolipide und Isoprenoide zu finden, die über eine Etherbindung an das Glycerin gebunden sind. Der Translationsapparat dieser Organismen ist gegenüber Chloramphenicol unempfindlich, wird jedoch durch das Diphtherietoxin gehemmt. Dies ist auf den Proteinbiosyntheseapparat zurückzuführen, der einige Proteine umfasst, die große Ähnlichkeiten zu Proteinen aus Eukaryonten aufweisen und in Bakterien in dieser Form nicht gefunden werden. So besitzen die *Archaea* wie die *Bacteria* nur eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, deren Untereinheitenstruktur jedoch den korrespondierenden Enzymen aus Eukaryonten homolog ist (ZILLIG et al., 1982). Anstelle von Formyl-Methionin wird Methionin als Startaminosäure eingebaut (JONES et al., 1987). Zudem konnten in zellfreien Transkriptionssystemen von *Methanococcus voltae* TATA-Bindeproteine aus *Saccharomyces cerevisiae* oder *Homo sapiens* archaeele Transkriptionsfaktoren ersetzen (WETTACH et al., 1995). Ferner wurden Proteine für die DNA-Reparatur identifiziert, die homolog zu den korrespondierenden Enzymen aus Eukaryonten sind, jedoch nicht in den Bakterien gefunden

wurden (DI RUGGIERO et al., 1999). Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass die *Archaea* hinsichtlich der Transkription, Translation und Replikation den *Eukarya* nahestehen, stoffwechselphysiologisch jedoch eher den *Bacteria* ähneln. Anhand der in den letzten Jahren durchgeführten Genomprojekte, die zur vollständigen Aufklärung vieler archaeellen Genome führten, konnten diese Befunde bestätigt werden (BULT et al., 1996; KLENK et al., 1997; SMITH et al., 1997; GALAGAN et al., 2002; DEPPENMEIER et al., 2002).

Die in dieser Arbeit untersuchten Organismen *Archaeoglobus fulgidus*, und die Vertreter der Ordnung *Methanosarcinales*, *Methanosarcina mazei* Gö1 und *Methanosarcina acetivorans* werden zur Gruppe der Euryarchaeota gezählt, obwohl sie sich physiologisch und morphologisch unterscheiden. *A. fulgidus* gehört zur Ordnung der *Archaeoglobales*, die einzige bekannte Ordnung innerhalb der *Archaea*, die zur Sulfatreduktion befähigt ist (STETTER et al., 1987). Der obligat anaerobe, hyperthermophile Organismus wächst in einem Temperaturbereich zwischen 62 und 92 °C, mit einem Wachstumsoptimum bei 83 °C. *A. fulgidus* kann sowohl chemoorganotroph mit einer Reihe von C-Verbindungen (z.B. Laktat, Pyruvat, 2,3-Butandiol) als auch chemolithoautotroph mit H₂, Thiosulfat und CO₂ wachsen (STETTER, 1988; VORHOLT et al., 1995). Er tritt vor allem in submarinen Standorten an hydrothermalen Arealen auf. Phylogenetisch sind die *Archaeoglobales* mit den oben erwähnten *Methanosarcinales* nahe verwandt und stellen eine Verbindung zwischen den methanogenen und den schwefelabhängigen, extrem thermophilen Archaea dar (THAUER, 1998).

Methanosarcina mazei Gö1 gehört zu den methanogenen Archaea, welche in stoffwechselphysiologischer Hinsicht in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Die obligat hydrogenotrophen Organismen (z.B. Vertreter der Ordnung *Methanobacteriales* und *Methanococcales*) haben ein Substratspektrum, welches auf H₂/CO₂ und Formiat beschränkt ist, während methylotrophe Organismen der Ordnung *Methanosarcinales* einfache C₁-Verbindungen wie Methanol und Methylamine verwerten. Darüber hinaus können einige Vertreter dieser Gruppe auch Acetat bzw. H₂/CO₂ als Energie und Kohlenstoffquelle nutzen (JARRELL und KALMOKOFF, 1988; WHITMAN et al., 1991; BOONE et al., 1993). Die strikt anaeroben, methanogenen Archaea stellen mit ihrer Fähigkeit, die oben genannten Kohlenstoffverbindungen zu Methan umzusetzen, das letzte Glied der anaeroben Nahrungskette dar und sind somit ein wichtiger Teil des globalen Kohlenstoffkreislaufs

(GARCIA et al., 2000). Es wird angenommen, dass ca. 60 % des Methangehalts der Atmosphäre auf den Prozess der Methanogenese zurückzuführen sind (DEPPENMEIER, 2002 a). Dort trägt Methan neben CO₂ erheblich zum sogenannten Treibhauseffekt bei. Zu den Habitaten der methanogenen Archaea zählen natürliche Systeme wie Wattenmeere, Sumpf- und Tundragebiete, sowie die Sedimente von Seen, Flüssen und anderen Gewässern, aber auch der Wiederkäuerpansen und von Menschen geschaffene Systeme, wie etwa Reisfelder und Faultürme der Kläranlagen.

A. fulgidus und *Ms. mazei* Gö1 verfügen über spezielle Cofaktoren, die in Bakterien in der Regel nicht gefunden werden. So dienen Methanofuran und Tetrahydromethanopterin als C₁-Gruppenüberträger. Kürzlich konnten durch die Entschlüsselungen der Genome von *Ms. mazei* Gö1 und *Ms. acetivorans* Gene für Tetrahydrofolat-abhängige Enzyme identifiziert werden, welche bis zu diesem Zeitpunkt ausschließlich nicht-methanogenen Organismen zugeschrieben wurden. Da diese Proteine hoch homolog zu bakteriellen Enzymen sind, deutet dieser Befund auf einen lateralen Gentransfer zwischen *Methanosarcina*-Arten und Bakterien hin (DEPPENMEIER et al., 2002). Aufgrund des Fehlens von Coenzym M, Coenzym F₄₃₀ und der Methyl-Coenzym M-Reduktase ist *A. fulgidus* nicht zur Methanogenese befähigt. Beide Organismengruppen verwenden als zentralen Elektronenüberträger das 5-Deazaflavin-Derivat F₄₂₀, das in chemischer Hinsicht mit dem monocyclischen Nicotinamid der *Bakteria* und *Eukarya* vergleichbar ist. Die bei der Oxidation von Methyl-Gruppen anfallende Reduktionsäquivalente werden auf das Coenzym F₄₂₀ übertragen, welches von einem zentralen Enzymkomplex, der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase, regeneriert wird. BÄUMER et al. (2000) konnten zeigen, dass die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *Ms. mazei* Gö1 eine Redox-getriebene Protonenpumpe ist und damit einen Teil des energiekonservierenden Systems darstellt. Es wird vermutet, dass der Elektronentransfer durch die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *A. fulgidus*, bei Wachstum auf Laktat und Sulfat, ebenfalls an eine Protonentranslokation gekoppelt ist.

Sequenzvergleiche zwischen der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase und der pro- und eukaryotischen NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) ergaben auffällige Homologien. Der Komplex I ist die initiale Komponente der Atmungskette, welche den Elektronentransfer von NADH + H⁺ auf Ubichinon oder im Fall von fakultativ anaeroben Bakterien auf Menachinon katalysiert. Im Zuge des Elektronentransfers durch den Komplex kommt es zu einer Protonentranslokation und zum Aufbau eines zur ATP-Synthese nutzbaren

Protonengradienten. Da bis heute nicht geklärt werden konnte, wie das Enzym den Elektronentransfer mit der Protonentranslokation koppelt, wird der Komplex I oft auch als L-förmige „black box“ bezeichnet (YAGI und YAGI, 2001). Der Hauptgrund für das mangelnde Wissen über die Funktion des Komplex I ist das Fehlen einer hochauflösenden 3D-Struktur. Daher erhofft man sich neue Erkenntnisse durch einen Vergleich der Struktur mit Komplex I-ähnlichen Enzymen, wie etwa der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase. Vor diesem Hintergrund sollten in dieser Arbeit einzelne Untereinheiten der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase heterolog in *E. coli* überproduziert und aufgereinigt werden, um dann die zur Lösung der 3D-Struktur notwendigen, Kristallisationsexperimente durchführen zu können. Außerdem sollten die prosthetischen Gruppen der aufgereinigten Proteine bestimmt und charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Archaea sind in Tab. 1, die Bakterien in Tab. 2 und die Klonierungsvektoren und rekombinanten Plasmide in Tab. 3 aufgelistet. Tab. 4 gibt einen Überblick über die verwendeten PCR- und Sequenzier-Oligonukleotide.

Tabelle 1: Archaea

<u>Stamm</u>	<u>DSM-Stamm-Nr.</u>
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	4304
<i>Methanosarcina mazei</i> Gö1	3647
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	2834

Tabelle 2: Bakterien

<u>Stamm</u>	<u>relevanter Geno-/ Phänotyp^a</u>	<u>Referenz / Herkunft</u>
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , supE44, Δ lacU169, ϕ 80 lacZ Δ M15, hsdR17(r_K^- K^+) thi-1, λ^- , recA1, gyrA96, relA1, endA1	HANAHAN, 1983
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	hsdF, gal (λ cIts857 <i>ind1</i> Sam7 <i>nin5 lacUV5-T7</i> <i>gene1</i>), <i>ompT</i> ⁻ , <i>lon</i> ⁻	STUDIER & MOFFAT, 1986

^aGenotyp-Abkürzungen für *E. coli*: siehe BACHMANN (1987)

Tabelle 3: Vektoren und rekombinante Plasmide

<u>Plasmid</u>	<u>Größe des Plasmids (kb)</u>	<u>relevante Merkmale</u>	<u><i>E. coli</i>-Wirtsstamm</u>	<u>Referenz / Herkunft</u>
pMPMT3	3,7	Tet ^r ; <i>lacZ</i> , T7-Promotor	DH5 α	M.P. Mayer
pET-21c	5,5	Amp ^r , <i>lacI</i> , T7 <i>lac</i> -Promotor	DH5 α	Fa. Novagen, Heidelberg
pASK-IBA3	3,2	Amp ^r , <i>Tet</i> -Repressor, <i>Tet</i> -Promotor, Strep-Tag II C-terminal	DH5 α	IBA, Göttingen
pASK-IBA5	3,2	Amp ^r , <i>Tet</i> -Repressor, <i>Tet</i> -Promotor, Strep-Tag II N-terminal	DH5 α	IBA, Göttingen
pZErO-2	3,3	Kan ^r , <i>lacZ</i> , T7-Promotor, <i>ccdB</i>	DH5 α	Fa. Invitrogen, Groningen, Niederlande
pHB5	6,9	pET-21c::1,4 <i>SacI</i> Fragment aus <i>fqo</i> -Operon (<i>fqoI</i> partiell + <i>fqoF</i>) <i>A. fulgidus</i>	DH5 α	H. Brüggemann
pKH4	4,8	pMPMT3::1,044 kb-PCR-Fragment aus <i>fqo</i> -Operon (<i>fqoF</i>) aus <i>A. fulgidus</i>	DH5 α	diese Arbeit
pKH2	4,8	pMPMT3::1,074 kb-PCR-Fragment aus <i>fqo</i> -Operon (<i>fqoF</i>) aus <i>A. fulgidus</i>	DH5 α	diese Arbeit
pKH17	4,4	pZErO-2::1.071 kb-PCR-Fragment aus <i>fpo</i> -Operon (<i>fpoF</i>) aus <i>Ms. acetivorans</i>	DH5 α	diese Arbeit
pKH9	6,5	pET-21c:: 1,044 kb <i>NdeI/BamHI</i> -Fragment aus pKH4	DH5 α	diese Arbeit

<u>Plasmid</u>	<u>Größe des Plasmids (kb)</u>	<u>relevante Merkmale</u>	<u><i>E. coli</i>-Wirtsstamm</u>	<u>Referenz / Herkunft</u>
pKH215	4,2	pASK-IBA5:: 1,074 kb <i>BsaI</i> Fragment aus pKH2	DH5 α	diese Arbeit
pASKH9	4,2	pASK- IBA5::1,071 kb- <i>BsaI</i> -Fragment aus pKH17	DH5 α	diese Arbeit
pASKH4	2,6	pASK- IBA3::0,394 kb- PCR-Fragment aus <i>fpo</i> -Operon (<i>fpoO</i>) aus <i>Ms.mazei</i> Gö1	DH5 α	diese Arbeit

Tabelle 4: Oligonukleotide

Bezeichnung	Bemerkung/Sequenz
fqof (fw)	Klonierung von <i>fqoF</i> in pET-21c über <i>NdeI/BamHI</i> ; „forward primer“ 5'-CGGC <u>CATATG</u> ATTGCAAGAGAGTGGCAGTTTG-3'
fqoF (rev)	Klonierung von <i>fqoF</i> in pET-21c über <i>NdeI/BamHI</i> ; „reverse primer“ 5'-GCC <u>GGATCC</u> TTACTCTTCAGATTTCTCTTCT-3'
T7promo	Sequenzierung von pET-21c-Vektoren; „forward primer“ 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7termi	Sequenzierung von pET-21c-Vektoren; „reverse primer“ 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
fqof strep (fw)	Klonierung von <i>fqoF</i> in pASK-IBA5 über <i>BsaI/BsaI</i> ; „forward primer“ 5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCCATTGCAA GAGAGTGGCAGTTTGC-3'

Bezeichnung	Bemerkung/Sequenz
fqof strep (rev)	Klonierung von <i>fqoF</i> in pASK-IBA5 über <i>BsaI/BsaI</i> ; „reverse primer“ 5'-ATGGTAGGTCTCATATCACTCTTCAGAT TTCTCTTCTTTCTTC-3'
fpoFac2 (fw)	Klonierung von <i>fpoF</i> in pASK-IBA5 über <i>BsaI/BsaI</i> ; „forward primer“ 5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCCCCACCAAAGA TTGCAGAAGTCATT-3'
fpoFac2 (rev)	Klonierung von <i>fpoF</i> in pASK-IBA5 über <i>BsaI/BsaI</i> ; „reverse primer“ 5'- ATGGTAGGTCTCATATCAGATCGTTTCAT TGCGGATTCCCGTC-3'
pASK-IBAfor	Sequenzierung von pASK-IBA-Vektoren; „forward primer“ 5'-AGAGTTATTTTACCACTCCCT-3'
pASK-IBArev	Sequenzierung von pASK-IBA-Vektoren; „reverse primer“ 5'-GACGCAGTAGCGGTAAACG-3'
fpoO (fw)	Klonierung von <i>fpoO</i> in pASK-IBA3 über <i>BsaI/BsaI</i> ; „forward primer“ 5'-GCCAGGTCTCAAATGACAGATTGCGACCTGTGT- 3'
fpoO (rev)	Klonierung von <i>fpoO</i> in pASK-IBA3 über <i>BsaI/BsaI</i> ; „forward primer“ 5'-CGTAGGTCTCAGCGCTATGCGGGTGTACGTGTT-3'
fpo promo fw1	Amplifizierung des Promotor-Bereichs des <i>fpo</i> Operons (208bp Fragment) 5'-GCAGAACTAGCTAGCTACCT-3'
fpo promo fw2	Amplifizierung des Promotor-Bereichs des <i>fpo</i> Operons (400bp Fragment) 5'-GGCACCTGGGTACAGACATT-3'

Bezeichnung	Bemerkung/Sequenz
fpo promo rev	Amplifizierung des Promotor-Bereichs des <i>fpo</i> Operons (208bp und 400bp Fragment) 5'-GCAAGAAATATGGCAACCGGT-3'
fpoF promo fw	Amplifizierung des Promotor-Bereichs des <i>fpoF</i> Gens (177 bp Fragment) 5'-GGTCCTGACAAAGAAAAGGCA-3'
fpoF promo rev	Amplifizierung des Promotor-Bereichs des <i>fpoF</i> Gens (177 bp Fragment) 5'-CTGCAATCTTTGGTGGCAATC-3'

2.2 Nährmedien, Puffer und Stammlösungen

2.2.1 Medien für *E. coli*

2.2.1.1 LB (Luria-Bertani)-Medium (SAMBROOK et al., 1989)

Bacto-Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

Der pH-Wert des Mediums brauchte nicht eingestellt zu werden. Zur Herstellung von Agarplatten wurde Japanagar zu einer Endkonzentration von 1,5 % (w/v) zugesetzt.

2.2.1.2 SOB-Medium (HANAHAN, 1983)

Trypton	20,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,19 g
H ₂ O _{dest.}	ad 990,00 ml

Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml einer sterilfiltrierten Lösung aus 1 M MgCl₂ und 1 M MgSO₄ zugegeben.

2.2.1.3 SOC-Medium

Caseinpepton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
Glucose	20 mM
H ₂ O	ad 100 ml
pH 7,0	

2.2.1.4 MI („maximal induction“) -Medium (MOTT et al., 1985, modifiziert)Medium:

Trypton	32 g
Hefeextrakt	20 g
H ₂ O _{bidest}	ad 950 ml
20 x M9	+ 50 ml

20 x M9:

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	120 g
KH ₂ PO ₄	60 g
NaCl	10 g
NH ₄ Cl	20 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Beide Lösungen wurden getrennt autoklaviert und 20 x M9 im Verhältnis 1:20 zum Medium gegeben. Anschließend folgte die Zugabe weiterer, sterilfiltrierter Lösungen:

0,1 M CaCl ₂	1 ml
1,0 M MgSO ₄	1 ml
FeNH ₄ Citrat	1 µM Endkonz. im Medium

Bei der heterologen Überproduktionen von Eisen-Schwefel-Flavo-Proteinen in dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) wurde dem MI-Medium Riboflavin (20 µg/ml) und zusätzliches Eisenammoniumcitrat (Gesamtkonzentration: 100 µg/ml) zugegeben (BRAUN et al., 1998).

2.2.2 Medium für *Ms. mazei* Gö1 und *Ms. acetivorans*

Zur Anzucht von *Ms. mazei* und *Ms. acetivorans* wurde ein auf DSM-Nr. 141 basierendes Mineralmedium verwendet, das aus aus folgenden Komponenten besteht:

K ₂ HPO ₄	0,348 g
KH ₂ PO ₄	0,227 g
NH ₄ Cl	0,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
CaCl ₂	0,25 g
NaCl	2,25 g
Na-Acetat	1,0 g
NaHCO ₃	0,85 g
Hefeextrakt	2,0 g
Caseinhydrolysat	2,0 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0 mg
Resazurinlösung (1mg/ml in H ₂ O _{demin.})	1,00 ml
SL6 (PFENNIG und LIPPERT, 1966)	3,0 ml
Vitaminlösung (WOLIN <i>et al.</i> , 1964)	10,0 ml
Methanol (99,5%)	150,00 mM
H ₂ O _{demin.}	ad 1000,00 ml

Der pH-Wert wurde mit 6 M NaOH auf 7,8 eingestellt und lag nach abschließender Begasung mit N₂/CO₂ bei 7,0. Zur Anaerobisierung des Mediums wurden die Komponenten außer den Reduktionsmitteln Na₂S und L-Cystein und dem Methanol in 1-l-Serumflaschen (Müller-Krempel AG, Bülach, Schweiz) abgefüllt. Diese bis zur Hälfte gefüllten Kulturgefäße wurden mit Stopfen und Septen aus Butylgummi oder Kautschuk verschlossen und über eine Kanüle mittels einer Vakuumpumpe (Diaphragma-Vakuumpumpe M 72 CII 17, Vacuumbrand GmbH & Co, Wertheim) unter Schütteln evakuiert und anschließend mit einem Gasgemisch aus N₂/CO₂ (80/20 % (v/v)) begast. Zur Entfernung von Restsauerstoff wurde das Gasgemisch über eine erhitzte Kupfersäule (Actimed 13 Doduco Chemie, Pforzheim) geleitet. Nach

dreimaliger Wiederholung stellte sich ein pH-Wert von ca. 7 ein. Danach wurde das Medium 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die Reduktionsmittel wurden als Stammlösungen (150 g/l) wie auch das Methanol (30 % ig) getrennt angesetzt. Zur Herstellung dieser Stammlösungen wurde zunächst das Wasser wie oben beschrieben anaerobisiert. Anstelle des N₂/CO₂-Gasgemischs wurde hierbei sauerstofffreies N₂ zum Begasen verwendet. Nach dem Anaerobisieren des Wassers wurden die Reduktionsmittel bzw. das Methanol unter N₂-Begasung zugesetzt. Danach erfolgte ein erneutes, dreimaliges Evakuieren und Begasen bevor für 20 min bei 121 °C autoklaviert wurde. Erst unmittelbar vor dem Beimpfen wurden dem Medium die entsprechenden Mengen der drei Stammlösungen zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C.

2.2.2.1 Vitaminlösung (WOLIN et al., 1964, modifiziert)

Biotin	2,00	mg
Folsäure	2,00	mg
Pyridoxin-HCl	10,00	mg
Thiamin-HCl	5,00	mg
Riboflavin	5,00	mg
Nikotinsäure	5,00	mg
Ca-Pantothenat	5,00	mg
Vitamin B ₁₂	0,01	mg
p-Aminobenzoesäure	5,00	mg
α-Liponsäure	1,00	mg
H ₂ O _{demin.}	1000,00	ml

Die Lösung wurde bei 4 °C unter Lichtschutz gelagert.

2.2.2.2 Spurenelementlösung SL6 (PFENNIG und LIPPERT, 1966 modifiziert)

ZnSO ₄	1000	mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	300	mg
H ₃ BO ₃	3000	mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	2000	mg
CuCl ₂ x 6 H ₂ O	100	mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	200	mg
Na ₂ MoO ₄	300	mg
H ₂ O _{demin.}	ad 1000,00	ml

2.2.3 Medium für *A. fulgidus*

Das modifizierte DSM-Medium Nr. 399 setzte sich wie folgt zusammen:

KCl	0,34	g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,75	g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3,45	g
NH ₄ Cl	0,25	g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,14	g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	0,18	g
NaCl	18,00	g
NaHCO ₃	5,5	g
Hefeextrakt	0,5	g
90 %iges L(+)-Laktat	10	ml
0,2 %iges (NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	1,0	ml
Wolfes Mineralienelexier ohne		
Titriplex; 10fach	1	ml
Resazurin 0,1 %ig	1	ml
Na ₂ S	0,5	g
H ₂ O _{demin.}	ad 1000	ml

Der pH-Wert wurde mit 6 M NaOH auf pH 7,8 eingestellt und lag nach abschließender Begasung mit N₂/CO₂ bei 7. Zur Herstellung des Mediums wurden die oben aufgeführten Komponenten außer Sulfid zusammengegeben und jeweils 500 ml in Müller-Krempel-Flaschen gegeben, die anschließend mit Gummistopfen gasdicht verschlossen wurden. Darauf folgte abwechselnd dreimaliges Evakuieren und Begasen mit N₂/CO₂ und Autoklavieren bei 121 °C. Vor dem Animpfen wurde dem Medium Na₂S x 9 H₂O zur Reduktion zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei ca. 78-80 °C.

2.2.3.1 Mineralienelexier nach Wolfe (modifiziert nach BALCH et al., 1979)

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3 g
NaCl	1 g
MnSO ₄ x 2 H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,18 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,18 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,01 g
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,02 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,01 g
H ₂ O bidest.	ad 1000 ml

Diesem Mineralienelexier wurde kein Titriplex zugesetzt. Mit HCl wurde der pH-Wert der Lösung auf 1,0 titriert.

2.2.4 Titan-(III)-Citrat-Lösung

Zur Reduktion wurde außer DTE/DTT auch eine Titan-(III)-Citrat-Lösung (ZEHNDER und WUHRMANN, 1976) verwendet, ein effektives Agens für eine schnelle Reduktion. Um eine 2 %ige Lösung herzustellen, wurden 4,86 g Kaliumcitrat x H₂O in 48,75 ml H₂O_{bide}st. aufgelöst und mit N₂ durchgast. In diese Lösung wurden 7,5 ml 15 %ige Titan-(III)-Chlorid-Lösung gegeben. Der pH-Wert von 7,0 wurde mit gesättigter K₂CO₃-Lösung eingestellt, wobei die Lösung weiter mit N₂ begast wurde.

2.2.5 Pufferlösungen

2.2.5.1 Waschpuffer für anaerobes Arbeiten

Zur Herstellung des Waschpuffers wurde eine 25 mM MOPS-Lösung mit 6 M NaOH auf einen pH-Wert von 7 gebracht. Für die anaeroben Reinigungsschritte und zur Verwendung im optisch-enzymatischen Test wurde der Puffer mit 1 mg/l Resazurin versetzt. Gelöster Sauerstoff wurde entfernt, indem die halbgefüllte Müller-Krempel-Serumflasche vor und nach der Zugabe von 2 oder 4 mM DTE zur Reduktion dreimal evakuiert und mit N₂ begast wurde.

2.2.5.2 Tris-NaCl-Puffer

20 mM Tris (Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan) und 50 mM NaCl wurden in H₂O_{bide}st. gelöst und mit 6 M HCl auf einen pH-Wert von 7,0 bis 7,5 eingestellt. Um den Puffer zu anaerobisieren wurde wie in 2.2.5.1 verfahren.

2.2.6 Medienzusätze

Antibiotika-Stammlösungen sowie IPTG und X-Gal wurden dem autoklavierten und auf mindestens 50 °C abgekühlten Medium zur Selektion entsprechender rekombinanter *E. coli*-Stämme zugesetzt.

<u>Medienzusatz:</u>	<u>Stammlösung:</u>	<u>Endkonzentration:</u>
Anhydrotetracyclin (AHT)	2 mg/ml in H ₂ O _{bidest} ^c	0,1 µl/ml
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	100 µg/ml
Tetracyclin	20 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	20 µg/ml
Kanamycin	20 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	20 µg/ml
IPTG	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest.}	40 µg/ml
X-Gal	40 mg/ml in N,N-Dimethylformamid	40 µg/ml

2.3 Zellanzucht

Die Kultivierung der strikt anaeroben Bakterien erfolgte nach der Hungate-Technik (HUNGATE, 1969) und den modifizierten Methoden von BRYANT (1972). Als Kulturgefäß dienten 16 ml Schraubdeckelröhrchen (Hungate-Röhrchen; Bellco Glass Inc., Vineland, New Jersey, USA) oder Müller-Krempel-Serumflaschen (Fa. Ochs Glasgerätebau, Bovenden). Als Verschluss für diese Glasgefäße dienten gasdichte Stopfen aus Butylgummi bzw. Naturkautschuk. Zur Zugabe sowie Entnahme von Flüssigkeiten wurden sterile Plastikspritzen benutzt. Als Gasatmosphäre diente bei der Anzucht ein N₂/CO₂-Gemisch im Verhältnis 80 % zu 20 %.

2.3.2 Anzucht von *Escherichia coli*

2.3.2.1 Anzucht für Plasmidpräparationen

E. coli wurde aerob in Pyrexröhrchen auf einem Rundschüttler in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (s. 2.2.6) bei 37 °C angezogen. Angeimpft wurde zumeist mit einer Einzelkolonie.

2.3.2.2 Anzucht im 10 Liter-Maßstab

Um heterolog in *E. coli* produzierte Protein in größeren Mengen zu gewinnen, wurden entsprechende rekombinante *E. coli* Stämme im 10 Liter-Maßstab angezogen. Als geeignete Gefäße stellten sich 20 Liter-Steilbrustflaschen heraus, die mit einem Gummistopfen zu

verschließen waren. Durch den Stopfen wurden Zu- und Abluftleitungen, an deren Enden sich jeweils eine mit Watte gefüllte Glasolive befand, sowie Probenentnahme- und Beimpfungsschläuche, geführt. Die Steilbrustflaschen wurden mit MI-Medium (s. 2.2.1.4) befüllt und mit Alufolie verschlossen. Der Gummistopfen mit den enthaltenen Zu- und Abführungen wurde separat in Alufolie verpackt und gemeinsam mit dem Kulturgefäß autoklaviert.

2.3.3 Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte von Kulturen (OD_{600nm}) wurde in 1-ml Plastikkuvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei 600 nm in einem Spektralphotometer UV-120.02 (Fa. Shimadzu Europa GmbH, Duisburg) verfolgt. Als Nullwert diente unbeimpftes Medium. Bei einer OD_{600nm} größer 0,3 wurden entsprechende Verdünnungen mit Medium hergestellt.

2.3.4 Ermittlung von Wachstumsparametern

Um die Wachstumsrate μ und die Verdopplungszeit g einer statischen Kultur bestimmen zu können, wurde der Logarithmus der gemessenen optischen Dichte (x) gegen die Zeit (t) aufgetragen. Im Bereich des exponentiellen Wachstums ergab sich eine Gerade, aus deren Steigung man die Wachstumsrate ermitteln konnte. Dieser Wert wiederum wurde der Berechnung der Verdopplungszeit zugrunde gelegt. Angewandt wurden folgende Formeln (SCHLEGEL, 1992):

$$\text{Wachstumsrate } \mu = \frac{m}{\log e} \quad \text{Steigung } m = \frac{\log x_t - \log x_0}{t - t_0}$$

$$\text{Verdopplungszeit } g = \frac{\ln 2}{\mu}$$

2.3.5 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert wurde mit einem WTW pH-Meter pH 526 (Fa. WTW GmbH, Weilheim) mit einer Glas-Calomel-Elektrode (Fa. Cahn-Ingold, Frankfurt) bestimmt. Vor den Messungen wurde das Gerät für den entsprechenden Messbereich mit Eichlösungen (pH 4,0 und pH 7,0 der Fa. Riedel de Haen AG, Hannover) geeicht.

2.3.6 Stammhaltung

Für die kurzfristige Stammhaltung wurde *E. coli* auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum-Zusatz (s. 2.2.6) bei 4 °C gelagert. Diese Kulturen wurden alle 4 Wochen überimpft. Für eine langfristige Stammhaltung wurden 850 µl eine Übernachtskultur mit 150 µl 87 %igem Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

Kulturen von *A. fulgidus* und *Ms. mazei/acetivorans* wurden zur mittelfristigen Lagerung in halbgefüllten 1 l-Müller-Krempel-Serumflaschen anaerob bei 4 °C gehalten.

2.3.7 Reinheitskontrollen

Kulturen von *E. coli*, *Ms. mazei*, *Ms. acetivorans* und *A. fulgidus* wurden im Phasenkontrastmikroskop (Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) anhand ihrer Zellmorphologie auf Reinheit überprüft. Auch die Koloniemorphologie wurde als Nachweis einer Reinkultur verwendet, wozu von *E. coli* Vereinzlungsausstriche auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum (s. 2.2.6) angelegt wurden.

2.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.4.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Zur Inaktivierung von Nukleasen wurden alle hitzestabilen Geräte und Lösungen durch Autoklavieren (20 min bei 121°C) sterilisiert. Nicht autoklavierbare Materialien wurden mit 70 %igem Ethanol (v/v) gespült oder mit 96 %igem Ethanol (v/v) abgeflammt. Hitzelabile Substanzen (z.B. Antibiotika, Lysozym) wurden sterilen Lösungen in pulverisierter Form zugegeben.

2.4.2 Isolierung von chromosomaler DNA

2.4.2.1 Isolierung chromosomaler DNA mit CTAB (AUSUBEL et al., 1987)

A. fulgidus wurde in mit 500 ml Medium gefüllten Müller-Krempel-Serumflaschen bis zur stationären Phase angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (8000 Upm, 4 °C, 15 min im GS 3-Rotor in der Sorvall Zentrifuge RC-5B (Fa. Du Pont, Bad Homburg) sedimentiert und das Pellet in 9,5 ml TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0,5 ml 10 % (w/v) SDS und 50 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) wurde 1 h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden 1,8 ml 5 M NaCl und 1,5 ml CTAB/NaCl-Lösung zugegeben, geschwenkt und die Suspension für 20 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Extraktion der Proteine wurden 13,3 ml (1 Vol.) Phenol/Chloroform 24:1 (v/v) zugegeben und gut gemischt. Nach der Zentrifugation (SS 34, 6000 Upm, 4 °C, 10 min) wurde die obere, wäßrige Phase mit 0,5 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol 1 : 1 (v/v) extrahiert. Zur resultierenden wäßrigen Phase wurden zur Fällung der DNA 0,6 Vol. Isopropanol gegeben und erneut zentrifugiert (6000 Upm, 4 °C, 15 min). Das Pellet wurde mit 1 ml eiskaltem 70 %igen (v/v) Ethanol gewaschen, für 10 min bei 60 °C getrocknet und danach in 2 ml TE-Puffer aufgenommen.

CTAB/NaCl-Lösung:

NaCl	4,1 g	700 mM
in 80 ml H ₂ O lösen, auf ca. 50 °C erwärmen		
CTAB	10 g	275 mM
langsam zugeben, lösen		
H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml	

TE-Puffer:

Tris/HCl	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8,0	

2.4.2.2 Isolierung genomischer DNA mit dem AquaPure[®]-Kit

Es kamen mehrere Methoden zur Isolierung genomischer DNA zur Anwendung. Ziel dabei war die Isolierung reiner und hochmolekularer DNA, die i. d. R. bessere Klonierungseigenschaften zeigte als stark fragmentierte DNA. Als geeignete Methode für die Isolierung genomischer DNA aus *Ms. acetivorans* erwies sich das AquaPure[®]-Genomic-DNA-Isolation-Kit (Fa. BioRad), wobei das Protokoll zur Isolierung von DNA aus Gram-negativen Bakterien leicht modifiziert verwendet wurde. Wichtig war, dass die Arbeitsschritte zügig vonstatten gingen. Nach ü. N.-Anzucht von *Ms. acetivorans* wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Nach unverzüglicher Zugabe von 300 µl „Genomic-DNA-Lysis-Solution“ zum Zellpellet (aus 5-50 ml Kulturvolumen), wurde dieses vorsichtig resuspendiert.

Bei 80 °C wurden dann die Zellen für 5 min lysiert. Wichtig war, dass die Zellen komplett lysierten. Gegebenenfalls wurden weniger Zellen eingesetzt oder Proteinase K zur Auflösung von Zellklumpen verwendet. Die RNA wurde anschließend durch Zugabe einer RNase-Lösung (4 mg/ml) abgedaut (15-30 min, 37 °C). Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl „Protein-Precipitation-Solution“ und die Durchmischung des Ansatzes. Dieser wurde dann abzentrifugiert (13000 Upm, 3 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt, das 300 µl Isopropanol enthielt. Anschließendes vorsichtiges Mischen und Abzentrifugieren (13000 Upm, 1 min) des Ansatzes ergab ein DNA-Pellet, das schließlich noch mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20-100 µl H₂O_{bidest} aufgenommen wurde.

2.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA

2.4.3.1 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Die Klonierungen und anschließenden DNA-Sequenzierungen erfordern einen hohen Reinheitsgrad der verwendeten DNA. Dies wurde durch Verwendung des „Wizard DNA Purification Kits“ (Fa. Promega, USA) bzw. des „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ (Fa. Quiagen, Hilden) für die Isolierung von Plasmid-DNA gewährleistet. Die verwendeten Lösungen lagen den Kit's bei. Eine *E. coli*-Kultur wurde über Nacht in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (s. 2.2.6) bei 37 °C angezogen, in sterile Reaktionsgefäße überführt und abzentrifugiert (6000 Upm, 6 min; Biofuge 15, Fa. Heraeus GmbH, Osterode). Das Zellpellet wurde in 200 µl „Cell Resuspension Solution“ resuspendiert, mit 200 µl „Cell Lysis Solution“ versetzt und geschwenkt, bis die Lösung klar wurde. Die Neutralisierung erfolgte unter Zugabe von 200 µl „Neutralisation Solution“ und erneutem Umschwenken. Nach Zentrifugation (14000 Upm, 10 min) wurde der Überstand mit 1 ml „DNA Purification Resin“ gemischt und der Ansatz auf eine Minisäule gegeben, die anschließend mit 2 ml „Wash Solution“ gewaschen wurde. Die Elution der Plasmid-DNA von der Säule erfolgte mit einer einminütigen Inkubation mit 50 µl TE-Puffer (pH 8,0; 50 °C) und einem Zentrifugationsschritt für 20 sec bei 12000 Upm. Die DNA wurde bei 4 °C gelagert.

2.4.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (BIRNBOIM und DOLY, 1979)

Diese Methode wurde eingesetzt, wenn eine große Anzahl von Klonen/Transformanten auf das Vorhandensein des richtigen rekombinanten Plasmides hin überprüft werden sollte. Der Vorteil dieser Methode liegt bei den geringeren Kosten, im Vergleich zu den kommerziell erhältlichen Kit's. Die isolierte Plasmid-DNA konnte zur Restriktionsanalyse oder als *template* für die PCR verwendet werden. Die Bakterien werden durch SDS in Gegenwart von NaOH in der Kälte lysiert, hierbei herrschen denaturierende Bedingungen für RNA, DNA und Proteine. Durch anschließende Neutralisation erfolgt eine Copräzipitation von SDS, chromosomaler DNA und Protein. Die Plasmid-DNA kann renaturieren und verbleibt in Lösung, durch eine Ethanol-Fällung sie kann sie anschließend isoliert werden.

3 ml einer in LB-Medium gewachsenen Zellsuspension wurden durch Zentrifugation sedimentiert, das Pellet in 100 µl P1-Puffer resuspendiert und mit 1 µl RNase-Lösung versetzt (Stammlösung 5 mg/ml). Der Zellaufschluß erfolgte in Form einer alkalischen SDS-Lyse durch Zusatz von 100 µl P2-Puffer, dreimaligem Umschwenken und fünfminütiger Inkubation bei RT. Danach wurde der Ansatz zur Neutralisierung mit 100 µl P3-Puffer versetzt, sofort für 20 min auf Eis inkubiert und dann zentrifugiert (15000 Upm, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 0,7 Vol. Isopropanol und erneuter Zentrifugation gefällt (15000 Upm, 4 °C, 30 min). Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst.

P1-Puffer:

Tris/HCl	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	400 µg/ml
pH 8,0	

P2-Puffer:

NaOH	200 mM
SDS	1 %

P3-Puffer:

Kaliumacetat/Essigsäure	2,55 M
pH 4,8	

2.4.4 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.4.4.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Um Proteine aus DNA-Lösungen zu entfernen, wurden diese mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und kräftig gemischt. Das eingesetzte Phenol war mit 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0) gesättigt. Zur Phasentrennung wurde 5 Minuten bei 15000 Upm zentrifugiert. Danach wurde die obere, wäßrige Phase mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, bis keine weiße Interphase mehr sichtbar war und anschließend mit Isopropanol oder Ethanol gefällt.

2.4.4.2 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrierung bzw. Entsalzung von Nukleinsäuren wurde eine Fällung mit 1 Vol. (v/v) Ammoniumacetat (7 M) durchgeführt, um den Gehalt an monovalenten Kationen zu erhöhen. Die Präzipitation erfolgte durch Zugabe von 2-3 Vol. eiskaltem 96 %igen Ethanol (v/v) oder 0,8 Vol. Isopropanol. Nach Durchmischen wurde die DNA bei der Ethanol-Fällung 30 min bei -20 °C bzw. bei der Isopropanolfällung ca. 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation (15000 Upm, 4 °C oder RT, 30 min) wurde das DNA-Pellet zweimal mit 1 ml eiskaltem 70 %igen Ethanol (v/v) gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in H₂O_{bidest.} oder TE-Puffer aufgenommen.

2.4.4.3 Mikrodialyse von Nukleinsäuren

Diese Methode wurde angewandt, wenn störende niedermolekulare Substanzen wie z.B. Salze aus DNA-Lösungen entfernt werden sollten (MARUSYK und SEARGANT, 1980). Die Mikrodialyse erhöht die Ligationseffizienz bei Verdauansätzen. 20-50 µl DNA-Lösung wurden vorsichtig auf einen sterilen Membranfilter (0,025 µm Porengröße, Filtertyp „VS“, Millipore GmbH, Eschborn) pipettiert und gegen steriles Wasser dialysiert. Dazu wurde der Filter mit seiner glänzenden Seite nach oben auf die Wasseroberfläche gelegt. Nach 60 min wurde die DNA-Lösung abgenommen und dann direkt für Ligationen eingesetzt.

2.4.4.4 Reinigung von DNA durch Absorption an Glasmilch (VOGELSTEIN und GILLESPIE, 1979)

Diese Methode beruht auf dem Prinzip der reversiblen Bindung von DNA an feingemahlene Glaspartikel („Glasmilch“) in Gegenwart von NaJ. Das Verfahren findet sowohl zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wie auch zur Reinigung aus Verdauansätzen

Verwendung. Die Aufreinigung erfolgte mit Lösungen aus dem kommerziell erhältlichen „Gene Clean Kit“ (US Bioclean, Cleveland, Ohio, USA). Das zu isolierende DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten, mit 3 Vol. NaJ versetzt und bei 55 °C im Heizblock geschmolzen. Nach Zugabe von 10 µl vollständig resuspendierter Glasmilch wurde der Ansatz kräftig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine kurze Zentrifugation (15000 Upm, RT, 20 sec, Biofuge 15, Fa. Heraeus GmbH, Osterode), woraufhin das resultierende Glasmilchpellet dreimal mit 500 µl „Rinse Buffer“ (-20 °C) gewaschen wurde. Es schloß sich eine fünfminütige Inkubation bei 37 °C zur Trocknung des Pellets an. Die Elution der DNA von der Glasmilch erfolgte durch Zugabe von 30 µl TE-Puffer oder Wasser und Inkubation für 5 min bei 50 °C im Heizblock. Nach kurzer Zentrifugation (siehe oben) sedimentierte die Glasmilch, und 28 µl des Überstandes wurden in ein neues E-Cup überführt, einer weiteren Zentrifugation unterzogen und 25 µl dieses Überstandes mit der gereinigten DNA bei 4 °C gelagert.

2.4.4.5 Reinigung von PCR-Produkten

Für die Reinigung von PCR-Produkten kam der „Qiaquick PCR Purification“-Kit (Fa. Qiagen GmbH, Hilden) zum Einsatz. Auch bei dieser Methode wird die DNA bei hohen Salzkonzentrationen reversibel an eine Silica-Membran gebunden. Bei der Durchführung wurde nach Anweisung des Herstellers verfahren. Zur Elution der DNA wurde steriles H₂O genommen und die gereinigte DNA anschließend bei 4 °C oder -20 °C gelagert.

2.4.4.6 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in 1 ml Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm mit Hilfe eines Photometers (Uvikon 810 Photometer, Kontron Instruments, Eching) ermittelt. Der Nullwert wurde mit Wasser oder TE-Puffer eingestellt, je nachdem, worin die DNA gelöst war. Für eine OD₂₆₀ von 1,00 wurden folgende Konzentrationen angenommen (SAMBROOK et al., 1989):

doppelsträngige DNA	50 µg/ml
einzelsträngige DNA	40 µg/ml
Oligonukleotide	31 µg/ml

Zusätzlich konnte die Reinheit einer DNA-Lösung durch OD-Bestimmungen bei 230 nm und 280 nm überprüft werden. Für reine DNA gilt:

$$OD_{260} : OD_{280} = 1,8 \quad (\text{SAMBROOK et al., 1989})$$

$$OD_{230} : OD_{260} : OD_{280} = 0,45 : 1,0 : 0,515 \quad (\text{MARMUR, 1961})$$

Verunreinigungen durch Proteine oder Phenol waren an einer deutlichen Steigerung der Absorption bei 280 nm erkennbar, Polysaccharide hingegen erhöhten die Absorption bei 230 nm. Je nach Verdünnung erfolgten alle Messungen gegen TE-Puffer oder Wasser. Konnte diese Methode der Konzentrationsbestimmung aufgrund der geringen Menge an vorhandener DNA nicht durchgeführt werden, wurde die Konzentration anhand der Intensität der Banden in Agarose-Minigelen abgeschätzt.

2.4.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten

2.4.5.1 Agarosegelelektrophorese

Eine der am häufigsten angewandten Methoden zur Charakterisierung von DNA ist die Agarosegelelektrophorese. Mit Hilfe dieser Technik können DNA-Moleküle im Gel aufgetrennt werden. Dabei hängt die Laufgeschwindigkeit eines DNA-Fragmentes von mehreren Faktoren ab, wie z.B. der Größe des DNA-Moleküles, der Größe der Gelporen bestimmt durch die Agarosekonzentration, der angelegten Spannung und den Salzkonzentrationen des Puffers. Es wurden 0,8 %-ige Gele für die Analyse von Restriktionsspaltungen und 1,2 %-ige Gele zur Auftrennung von PCR-Produkten in 1 x TAE-Puffer, der auch als Laufpuffer verwendet wurde, gegossen. Vor Beladen der Geltaschen wurde die DNA mit Ladepuffer im Verhältnis 10:1 vermischt, was zum einen der Beschwerung und zum anderen durch den enthaltenen Farbstoff Bromphenolblau der Markierung der Lauffront bei ca. 500 bp diente. Die Auftrennung erfolgte im Minigel (Hofer® HE33 Mini Horizontal Submarine Unit) bei einer Spannung von 60-100 V und einer Laufzeit von 45-90 min. Nach Beendigung der Gelelektrophorese erfolgte die Färbung der DNA durch Überführung des Geles in ein Ethidiumbromidbad für 10 min mit anschließender Entfärbung für 10 Minuten im Wasserbad. Mit Hilfe der Gel-Dokumentationsanlage (BioRad® GelDoc 1000) wurde die DNA bei UV-Licht durch das eingelagerte Ethidiumbromid sichtbar gemacht, fotografisch dokumentiert und eventuell bearbeitet („Multi-Analyst-V.1.1.1.“-Dokumentationsprogramm). Mittels eines Thermodruckers (Mitsubishi Video Copy Prozessor P66DE) konnten diese Bilder ausgedruckt werden.

50 x TAE-Puffer (SAMBROOK et al., 1989):

Tris	242 g	2 M
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	100 ml	50 mM
Essigsäure (konz.)	57 ml	1 M
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml	
pH 8,5		

Ladepuffer (SAMBROOK et al., 1989):

EDTA	19 mg	1,0 mM
Harnstoff	21 g	7,0 M
Saccharose	25 g	50,0 % (w/v)
Bromphenolblau	50 mg	0,1 % (w/v)
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 ml	
pH 7,0		

Aliquots der autoklavierten Lösungen wurden bei - 20 °C gelagert.

Ethidiumbromid-Stammlösung:

Die Stammlösung wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in Wasser angesetzt und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

2.4.5.2 Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Größe gelelektrophoretisch aufgetrennter, linearer DNA-Fragmente ermitteln zu können, wurde ein Längenstandard (MBI FERMENTAS GmbH, St.Leon-Rot) auf das Gel aufgetragen. Die Größe der erhaltenen Fragmente wurde durch den Vergleich der Laufstrecken mit denjenigen der bekannten Fragmente der 1 kb-Leiter bestimmt. In der folgenden Abb. 1 sind die zur Bestimmung herangezogenen Fragmentgrößen angegeben.

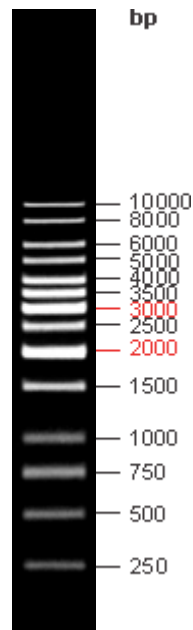
DNA-Längenstandard:

Abb. 1: 1 kb-Leiter auf einem 1 %igen Agarosegel

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Diese Methode der *in vitro*-Amplifikation von DNA diente zur Herstellung spezifischer DNA-Fragmente für Klonierungen. Als DNA-Polymerase wurde die TakaraExTaq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*, Fa. Takara, Japan), die Amplifikate mit 3'-Überhängen synthetisiert, eingesetzt. Um eine möglichst geringe Fehlerrate bei der DNA-Synthese zu gewährleisten, wurde außerdem die *Pfu*-Polymerase, die sich durch eine 3'→5'-Korrektur-Aktivität (Proof-Reading) auszeichnet, verwendet. Die eingesetzten Starteroligonukleotide (Primer) hatten eine Länge von 18-45 Basen (Fa. Life Technologies, Eggenstein und Fa. Metabion, Martinsried). Als Matrize diente chromosomale DNA von *A. fulgidus* bzw. *Ms. mazei* Göl oder *Ms. acetivorans*. Eine optimale Amplifikation war gewährleistet, wenn beide Primer den gleichen Schmelzpunkt (T_m) hatten und in gleicher Konzentration vorlagen. Die Berechnung des Schmelzpunktes erfolgte nach CHESTER und MARSHAK (1993):

$$T_m = 69,3 + 0,41 (\% \text{ G+C-Gehalt}) - 650/L$$

% G+C-Gehalt = prozentualer G+C-Gehalt des Primers

L = Länge des Primers

Die Standard-PCR-Reaktionen fanden in 50 µl-Ansätzen statt. Folgende Komponenten wurden - bis auf das Enzym - auf Eis zusammenpipettiert:

Matrizen-DNA	1,0 µg
Primer 1	0,5 µM
Primer 2	0,5 µM
dNTP-Gemisch	200,0 µM
10 x Reaktionspuffer	5,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,0 mM
BSA (20 mg/ml)	0,1 mg/ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 49,5 µl
DNA-Polymerase (2U/µl)	0,5 µl

Nach Durchmischung wurde der Ansatz im PCR-Thermoblock (Mini Cycler, MJ Research, Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf) 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend 2 min auf 80 °C temperiert. Während dieser Zeit erfolgte die Zugabe der Polymerase („hot start“). Zur Amplifizierung schlossen sich folgende Temperaturzyklen in 25-facher Wiederholung an:

Denaturierung	95 °C	45 s
Anlagerung	x °C	45 s
Polymerisierung	72 °C	y s

Die Anlagerungstemperatur war abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und lag im Idealfall 5 °C tiefer als diese. Die Dauer x der Polymerisierung betrug 1 min pro 1 kb zu amplifizierender DNA. Zur Optimierung der PCR konnten einzelne Parameter variiert werden wie z.B. die Anlagerungstemperatur und die Anzahl der Zyklen oder auch die Konzentrationen der eingesetzten Primer sowie der Matrizen-DNA. Ferner konnte die Spezifität durch Zugabe von DMSO (4 % [v/v]) und Verringerung der MgCl₂-Konzentration gesteigert werden. Nach Abschluß der Amplifikation wurde ein Aliquot im Agarosegel überprüft und anschließend der gesamte Ansatz aufgereinigt (s. 2.4.4.5).

2.6 Enzymatische Modifikation von DNA

2.6.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen liefert lineare Fragmente mit definierten Enden. Der Verdau erfolgte in den von den Herstellern der Restriktionsenzyme mitgelieferten Puffersystemen bei den empfohlenen Temperaturen. In analytischen Ansätzen betrug das Gesamtvolumen 20 µl, wobei ca. 1-2 µg DNA und 3-5 U Enzym/µg DNA 2 h inkubiert wurden. In präparativen Ansätzen wurden bis zu 15 µg DNA über Nacht verdaut in einem Volumen von insgesamt 100 µl. Im Endvolumen lag das Enzym 1 : 10 verdünnt vor, um eine Gesamtkonzentration von 5 % Glycerin nicht zu überschreiten, die sich störend auf die Spaltungsreaktion hätte auswirken können (Aufbewahrung der Enzyme in Puffern mit einem Gehalt von 50 % [v/v] Glycerin). Sollten Fragmente mit zwei verschiedenen Enzymen verdaut werden, die unterschiedliche Pufferbedingungen benötigten, so wurde zuerst ein Einfachverdau in dem System mit niedriger Ionenstärke durchgeführt und diese dann anschließend für das zweite Enzym erhöht. Falls eine Inaktivierung der Restriktionsenzyme erforderlich war, wurde der Verdauansatz 15 min bei 65 °C inkubiert oder bei Enzymen, die sich nicht hitzeinaktivieren ließen eine Phenol/Chloroform Fällung durchgeführt (2.4.4.1). Die Spaltprodukte wurden im Agarosegel überprüft.

2.6.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Vor der Ligation von Vektor-DNA mit den zu klonierenden DNA-Fragmenten (s. 2.6.4) wurde die 5'-Phosphatgruppe der Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm abgespalten. Dadurch sollte die Ligation von Vektor-Fragmenten mit sich selbst oder mit anderen linearen Vektor-Fragmenten verhindert werden (SAMBROOK et al., 1989). Die Dephosphorylierung wurde direkt im Verdauansatz durchgeführt (GREENE und GUARENTE, 1987). Nach der Spaltung des Vektors wurde 1 U alkalische Phosphatase pro 10 µg DNA zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut 1 U Enzym zugegeben und die Inkubation wiederholt. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Inkubation für 15 min bei 65 °C und die DNA mit Glasmilch gereinigt (s. 2.4.4.4). Bei Vektor-DNA, die mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut wurde, entfiel die Dephosphorylierung.

2.6.3 Herstellung von glatten Enden und Phosphorylierung von 5'-Hydroxyl-Enden bei DNA-Fragmenten

Da thermostabile Polymerasen, die bei Amplifikationsreaktionen eingesetzt werden (*Tfl*-Polymerase, ExTag-Polymerase), als letztes Nukleotid meistens unspezifisch ein Adenosin an das amplifizierte DNA-Fragment anfügen, mußten diese Enden geglättet werden, bevor sie zur Ligation eingesetzt werden konnten. Außerdem mußte sichergestellt sein, daß die DNA-Fragmente an den 5'-Enden phosphoryliert vorlagen, um eine Ligation über glatte Enden zu ermöglichen. Hierzu wurde DNA-Polymerase I eingesetzt, die überhängende, einzelsträngige DNA abbauen kann, und T₄-Polynukleotid-Kinase, die in Anwesenheit von ATP freie 5'-Enden phosphoryliert. Beide Enzyme arbeiten gut in 1,5 x KGB-Puffer, so daß beide Reaktionen in einem Ansatz durchgeführt wurden. Dieser bestand aus:

DNA	0,5-1 µg
KGB-Puffer (10 x)	3 µl
ATP (10 mM)	3 µl
DNA-Polymerase I (5U/µl)	1 µl
T ₄ -Polynukleotid-Kinase (2U/µl)	1 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 20 µl

Der Ansatz wurde 45 min bei 37 °C inkubiert, anschließend mit Glasmilch gereinigt und zur Ligation eingesetzt.

KGB-Puffer (10 x):

K-Glutamat	1,00 M
Tris-Acetat	0,25 M
Mg-Acetat	0,10 M
Rinderserumalbumin	0,50 mg/ml
β-Mercaptoethanol	5,00 mM
pH 7,5	

2.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden Phosphodiesterbindungen zwischen doppelsträngigen DNA-Fragmenten geknüpft, die freie 3'-Hydroxylenden und 5'-Phosphatenden aufweisen. Um die Ligationseffizienz zu erhöhen, wurde ein Überschuß an Insert-DNA eingesetzt (Verhältnis Vektor- zu Insert-DNA von etwa 1: 4). Die Ligation erfolgte im 20 µl Ansatz und in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem:

Vektor-DNA (in H ₂ O)	0,2 – 2 µg
Insert-DNA (in H ₂ O)	0,8 - 8 µg
ATP (10 mM)	2 µl
10 x T ₄ -Ligase-Puffer	2 µl
T ₄ -DNA-Ligase (1 U/µl)	1 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei Ligationen von kohäsiven Enden über Nacht bei 16 °C. Zur Ligation glatter Enden wurden die Ansätze 3 h bei Raumtemperatur inkubiert.

2.7 Übertragung von DNA in *E. coli* durch Transformation

2.7.1 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation (INOUE et al., 1990)

250 ml SOB-Medium wurden mit der über Nacht gewachsenen *E. coli*-Vorkultur 3 %ig angeimpft und bei 18 °C im Schüttelwasserbad bis zu einer OD_{600nm} von ca. 0,6 angezogen. Die Zellen wurden dann 10 min im Eisbad geschwenkt und im vorgekühlten GSA-Rotor abzentrifugiert (4000 Upm, 4 °C, 10 min in Sorvall Zentrifuge RC-5B, Fa. Du Pont Instruments, Bad Homburg). Das Zellpellet wurde vorsichtig in 80 ml kaltem Transformationspuffer (TB) resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und unter gleichen Bedingungen erneut abzentrifugiert. Nach schonender Suspendierung in 20 ml TB wurden 1,5 ml DMSO (7 % [v/v] Endkonzentration) langsam unter Schwenken zugesetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Aliquots von 200 µl wurden in vorgekühlte Reaktionsgefäße transferiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -70 °C über mehrere Monate ohne Verlust der Kompetenz.

Transformationspuffer (TB):

PIPES	10 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
MnCl ₂	55 mM
pH 6,7	

Alle Komponenten mit Ausnahme des Mangansalzes wurden zusammengegeben, der pH-Wert mit KOH eingestellt, eine Stunde gerührt und nachjustiert. Dann wurde MnCl₂ zugesetzt, die Lösung sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

2.7.2. Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation

Alle Lösungen und Gefäße müssen eisgekühlt verwendet werden. Die hauptsächliche Aufgabe der Zellpräparation ist die Beseitigung von Salzen, um die Ionenstärke der Suspension zu verringern. Bei der Vorbereitung von pLys-Stämmen dürfen die Zellpellets nur äußerst vorsichtig resuspendiert werden.

- Animpfen von 500 ml Medium mit 2,5 ml Übernachtskultur
- Wachstum bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,7 unter starkem Schütteln bei 37 °C
- Zellen 10 – 15 min auf Eis lagern
- Abzentrifugieren der Zellen bei 5000 Upm im GSA-Rotor für 20 min bei 4 °C
- Resuspension des Pellets in der verbliebenen Flüssigkeit
- Waschen mit 500 ml sterilem H₂O_{bidest}
- Abzentrifugieren der Zellen bei 5000 Upm im GSA-Rotor für 20 min bei 4 °C
- Resuspension des Pellets in 40 ml 10 % Glycerin, gut mischen
- Abzentrifugieren der Zellen bei 4000 Upm im GSA-Rotor für 10 min bei 4 °C
- Zugabe von ca. 1 Volumen 10 % Glycerin
- Zellen resuspendieren und aliquotieren (60µl)
- Lagerung bei –70 °C

2.7.3 Transformation durch Hitzeschock

Zur Transformation wurden 200 µl der bei - 70 °C gelagerten Zellen eingesetzt. Sie mußten langsam auf Eis auftauen. Nach Zugabe des gesamten Ligase-Ansatzes (20 µl) und leichtem Mischen wurden die Zellen 30 min bis 1 h auf Eis inkubiert, für 90 sec bei 42 °C hitzegeschockt, dann wieder 2 min auf Eis gelegt und mit 500 µl LB-Medium vermischt. Es schloß sich eine Inkubation auf dem Schüttler bei 37 °C für 1 h an. Danach wurden 100 µl auf entsprechendem Selektivagar ausplattiert, bei 37 °C inkubiert und der restliche Ansatz abzentrifugiert (8000 Upm, RT, 10 min; Biofuge 15, Fa. Heraeus Instruments, Osterode). Das Pellet wurde in 100 µl LB-Medium aufgenommen und ebenfalls ausplattiert.

2.7.4 Transformation durch Elektroporation

Durch kurze elektrische Pulse wird die Zellmembran für DNA passierbar gemacht. Die Transformationseffizienz bei dieser Methode liegt bei ca. 10^9 - 10^{10} Transformanden pro µg eingesetzter DNA. Entscheidende Parameter sind die Stärke des elektrischen Feldes, die Dauer des Pulses und die Konzentration an DNA. Dabei muß ein Kompromiß zwischen der Erhöhung der Transformationseffizienz und dem Absinken der Lebensfähigkeit der Zellen durch höhere Feldstärken und längere Pulszeiten gefunden werden. Es wurde folgendermaßen verfahren:

- Mischen von 0,1-1µg DNA mit 60 µl Zellsuspension auf Eis in der Elektroporationsküvette
- Elektroporationsparameter: 2500 V, 25 µF, 200 Ω. Die Entladungszeit sollte zwischen 3 und 5 msec liegen bei trockenen Kontakten.
- Sofortiges Umfüllen in E-Cup und Zugabe von 1 ml SOC-Medium (s. 2.2.1.3) auf Eis
- Inkubation für 1 h bei 37 °C im Schüttler
- Ausplattieren von 25 µl auf Selektionsmedium
- Inkubation bei 37 °C über Nacht

2.7.5 Blau-Weiß-Test zur Selektion rekombinanter Klone

Zur Selektion von Transformanten, die ein Insert enthielten, wurde dem Agar IPTG (48 µg/ml) und β-D-Galactosid (X-Gal; 40 µg/ml) zugesetzt (HOROWITZ et al., 1964). Der verwendete *E. coli* Klonierstamm DH5α ist durch eine Deletion im *lacZ*-Gen gekennzeichnet und kann daher keine aktive β-Galactosidase mehr bilden. Durch Transformation mit Plasmiden wie pGEM(7+) oder pMPMT3, die über die α-Untereinheit der β-Galactosidase verfügen, in der sich wiederum die Multiklonierungsstelle befindet, kommt es zur Bildung eines aktiven Enzyms. Dies kann auf X-Gal und IPTG haltigen Platten sichtbar gemacht werden, auf denen das *lacZ*-Gen durch IPTG induziert wird und die β-Galactosidase das Glukoseanalogon X-Gal spaltet, wonach durch Luftoxidation ein blauer Farbstoff entsteht. Soll in die Multiklonierungsstelle des Plasmides ein Insert ligiert werden, kann man den Erfolg der Insertion nach Transformation anhand der Kolonienfarbe sehen. Zellen, die Plasmide mit einer Insertion in der Multiklonierungsstelle und damit im *lacZ*-Gen beinhalten, können keine aktive β-Galactosidase bilden und erscheinen weiß (Blau/Weiß-Selektion).

2.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA erfolgte im „Göttinger Genomics Laboratory“ (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen) am ABI PRISM 337 DNA-Sequencer.

2.8.1 Analyse der Sequenzdaten

Die Sequenzdaten konnten manuell aus den Kurvenverläufen mit dem Programm ABI Edit View 1.0.1 abgeleitet werden. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte auf Macintosh Computern (Fa. Apple Computer Inc., Cupertino, USA) mit Hilfe des Programms DNA-Strider (MARCK, 1988). Damit konnten offene Leserahmen ermittelt und Protein-Sequenzen abgeleitet sowie auf hydrophobe bzw. hydrophile Bereiche untersucht werden. Weitergehende Analysen wurden mit dem „Wisconsin Genetics Computer Group Sequence Analysis Software Package“ (GCG Package, Version 8.0; University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, USA) nach DEVEREUX et al. (1984) durchgeführt.

Dazu zählte der im Internet angebotene Service der NCBI, der den Sequenzabgleich durch das Programm „Blast“ mit Daten der PIR-, NBRF-, SWISSPROT-, EMBL- und GENBANK-Datenbanken (PEARSON & LIPMAN, 1988) ermöglichte.

2.9 Arbeiten mit Proteinen

2.9.1 Einengen und Entsalzen von Proteinlösungen

Die Centrisart-Röhrchen (Fa. Sartorius, Göttingen) eignen sich zum Einengen kleiner Proteinmengen bis zu einem maximalen Volumen von 3,5 ml. Unter diesen Bedingungen bieten sie die schnellste und schonendste Möglichkeit der Einengung. Hierzu wurden die Röhrchen bei 3000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Die Proteinentnahme erfolgte zur Schonung der Membran mit einer mit einem Schlauch bestückten Pasteur-Pipette. Die Außenröhrchen wurden mit einer 0,5 M NaOH-Lösung gereinigt und mit H₂O_{bidest.} gespült. Die den Filter enthaltenden Innenröhrchen konnten nur mit H₂O_{bidest.} gespült werden, da die Verklebung sich bei Verwendung denaturierender Agenzien löste und die Röhrchen undicht wurden. Die benutzten Röhrchen wurden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Eine alternative Möglichkeit der Lagerung bestand in der Trocknung der Röhrchen. Dazu wurden 0,5 ml einer 10 %igen Glycerinlösung in H₂O_{bidest.} eingefüllt und die Röhrchen damit getrocknet. So wurde verhindert, daß die Membranen schrumpfen, sich vom Trägermaterial lösen und dadurch die Filtrationsröhrchen außer Funktion gesetzt werden.

2.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte nach BRADFORD (1976, mod.). Diese Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffes „Coomassie-Brilliant-Blue“ an Proteine. 20 µl Probe wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte in 1 ml Plastikkuvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei 595 nm gegen H₂O als Leerwert (Spektralphotometer Uvikon 810, Kontron Instruments, Eching). Bei der Proteinbestimmung von ganzen Zellen wurden dem Ansatz vor der Inkubation noch 50 µl 1 M NaOH zugefügt. Die Eichgerade wurde mit Rinderserumalbumin im Bereich von 0-20 µg Protein aufgenommen.

Bradford-Reagenz:

Serva Blau G-250	70 mg
Ethanol (96 % [v/v])	50 ml
H ₃ PO ₄ (85 % [v/v])	100 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Der Farbstoff wurde in Ethanol gelöst, erst mit Phosphorsäure, dann mit Wasser aufgefüllt und filtriert. Das Reagenz hatte eine bräunliche Farbe und wurde lichtgeschützt bei RT aufbewahrt.

2.9.3 Bestimmung der Molekularmassen von Proteinen

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen in SDS-Gelen wurden gleichzeitig auch entsprechende Standardproteine mit aufgetrennt.

<u>Standardproteine</u>	<u>LMW-Marker [kDa]^a</u>
Phosphorylase b	94,0
Rinderserumalbumin	67,0
Ovalbumin	43,0
Carboanhydrase	30,0
Trypsin-Inhibitor	20,1
Lactalbumin	14,4

^aFa. Pharmacia GmbH, Freiburg

Nach Anfärbung der Gele konnte die Molekularmasse von Proteinen berechnet werden, indem die Wanderungstrecke im Gel mit der von den Markerproteinen verglichen wurde. Die Auftragung des Logarithmus der Molekularmassen der Standardproteine gegen deren R_F -Wert ergab eine Eichgerade, aus der die Molekularmassen der unbekannt Proteine abgelesen werden konnten.

$$R_F\text{-Wert} = \frac{\text{Wanderungstrecke des Proteins}}{\text{Wanderungstrecke des Farbstoffes}}$$

2.9.4 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von Proteinen

Zur Reinheitskontrolle und Molekularmassenbestimmung wurden die untersuchten Proteine unter denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE, nach LAEMMLI, 1970, mod.). Das anionische Detergenz SDS zerstört die Quartärstruktur von Proteinen und lagert sich an die hydrophoben Regionen des Proteins an. Dadurch wird die

Eigenladung des Proteins überdeckt, und es findet nur noch eine Auftrennung nach der Masse und nicht nach der Ladung statt. Zur besseren Trennungsleistung arbeitet man zusätzlich mit diskontinuierlichen Gelen (Sammel- und Trenngel). Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Minigelkammer (Fa. Biometra, Göttingen) mit 10 x 10 cm Glasplatten und 1 mm Spacern durchgeführt.

Die Lösungen setzten sich folgendermaßen zusammen:

<u>Acrylamid-Lösung</u>	Acrylamid	30,0 g
	Bisacrylamid	0,8 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml
	Anschließend erfolgte eine Filtration.	
<u>Trenngelpuffer</u>	Tris/HCl	22,77 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml
	pH 8,8	
<u>Sammelgelpuffer</u>	Tris/HCl	7,57 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml
	pH 6,8	
<u>SDS-Lösung</u>	SDS	0,5 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml
<u>Ammoniumpersulfat-Lösung</u>	APS	0,1 g
	H ₂ O _{bidest.}	940 µl
<u>Elektrodenpuffer</u>	Tris	3,0 g
	Glycin	14,4 g
	SDS	1,0 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml
	pH 8,3 mit Glycin einstellen	

<u>Probenauftragspuffer I</u>	Sammelgelpuffer	2,0 ml
	SDS	0,2 g
	Bromphenolblau (1 % in Ethanol)	0,1 ml
	Mercaptoethanol	0,5 ml
	Glycerin	5,0 ml
	H ₂ O _{bidest.}	ad 10,0 ml

Die Lösungen wurden je nach gewünschter Acrylamidkonzentration folgendermaßen gemischt:

<u>Lösung</u>	<u>Trenngel</u>			<u>Sammelgel</u>
	14 %	10 %	8 %	5 %
Acrylamid-Lösung	2,8 ml	2 ml	1,6 ml	0,33 ml
Trenngelpuffer	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	0,4 ml
SDS-Lösung	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	0,4 ml
H ₂ O _{bidest.}	0,8 ml	1,6 ml	2,0 ml	0,87 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
APS	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

Die einzelnen Komponenten des Trenngels wurden gemischt, zwischen die mit H₂O_{bidest.} und Ethanol (70 % [v/v]) gesäuberten Glasplatten gegossen und mit H₂O_{bidest.} überschichtet, damit eine ebene Geloberfläche entstand. Nach dem Polymerisieren wurde das Wasser mit Filterpapier entfernt, die frisch angesetzte Sammelgellösung über das Trenngel geschichtet und der Kamm zur Taschenformung luftblasenfrei eingesetzt. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Dichtung und der Kamm entfernt und das Gel in die mit Elektrodenpuffer gefüllte Kammer gespannt. Bis zu 25 µl Probe (Proteingehalt 1-20 µg) wurden mit dem gleichen Volumen Probenauftragspuffer vermischt und für 10 min in siedendem H₂O inkubiert. Aufgetragen wurde mit einer Hamiltonspritze. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei RT und konstanter Stromstärke von 25 mA und war beendet, wenn die blaue Lauffront das Gelende erreicht hatte.

2.9.5 Native Gradienten-PAGE

Zur Bestimmung der molekularen Masse nativer Proteine wurden lineare Gradientengele von 5-27,5 % Acrylamid hergestellt.

Lösungen:

<u>Leichte Lösung L (5 %)</u>	Acrylamid	10,0 g
	Bisacrylamid	0,5 g
	Gelpuffer	ad 200 ml
<u>Schwere Lösung S (27,5 %)</u>	Acrylamid	52,52 g
	Bisacrylamid	2,75 g
	Gelpuffer	ad 200 ml

Beide Lösungen wurden vor Gebrauch filtriert. Die Lagerung erfolgte abgedunkelt bei 4 °C.

<u>Gelpuffer (0,25 M)</u> (bei 4 °C lagern)	Tris-Base	30,25 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml
	pH 8,5	

<u>Ammoniumpersulfat (10 %)</u> (APS, stets frisch ansetzen)	Ammoniumpersulfat	0,1 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

<u>Elektrodenpuffer</u> (bei 4 °C lagern)	Tris-Base	6,0 g
	Glycin	28,8 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml
	(vor Gebrauch 1:5 verdünnen)	

Die Herstellung eines nativen Gradientengels mit Polyacrylamid-Konzentrationen von 5-27,5 % erfolgte mittels eines Gradientenmischers. In die vordere Kammer wurden 3 ml der schweren Lösung, in die hintere 3 ml der leichten Lösung gegeben und mit jeweils 1,5 µl TEMED versetzt. Nach Zugabe von je 9 µl APS wurde die Verbindung zwischen den zwei Kammern geöffnet und das Gel unter Rühren mit 0,4 ml/min durch eine Peristaltikpumpe zwischen die vorbereiteten Glasplatten gepumpt. Nach dem vollständigen Einfüllen des Gradientengels wurde dieses sofort mit 200 µl H₂O_{bidest.} überschichtet. Das Wasser wurde nach dem Auspolymerisieren des Gels wieder entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel (2 ml der leichten Lösung + 4 µl TEMED + 15 µl APS) gegossen und zur Ausformung der

Taschen ein Kamm eingesetzt. Die zu analysierenden Proben (18 µl) wurden mit 2 µl Beschwerer-Lösung versetzt, durchmischt und mit einer 100 µl Hamilton-Spritze (Hamilton, Reno, USA) in die Kammern des Gels aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einer Biometra-Mini-Gel-Elektrophorese-Einheit bei 4 °C und 150 V für 6 h. Als Standard diente ein „HMW Calibration Kit“ (Pharmacia, Freiburg) für Proteine mit hohem Molekulargewicht.

Für die Bestimmung von Molekulargewichten erfolgte zunächst die Messung der Länge des Trenngels sowie die Bestimmung der genauen Wanderungstrecke der Proteine. Anhand dieser Daten erfolgte die Berechnung der Acrylamidkonzentration im Bereich der jeweiligen Bande (LAMBIN et al., 1976).

$$\% \text{ Acrylamid} = 5 [\%] + (\text{Laufstrecke Protein [cm]} \times 27,5 [\%] / \text{Länge Gradientengel [cm]})$$

Aus der Auftragung der Logarithmen der Eichprotein-Molekulargewichte gegen die Logarithmen der Acrylamidkonzentrationen im Trenngel (%) wurde eine Eichkurve erstellt, anhand derer das Molekulargewicht der untersuchten Proteine über ihre Wanderungstrecken im Gel ermittelt werden konnten.

Eine Lösung mit folgenden Proteinen wurde für die Eichung eingesetzt:

<u>Standardproteine</u>	<u>HMW-Marker [kDa]^a</u>
Thyroglobulin	669
Ferritin	440
Catalase	232
Laktat Dehydrogenase	140
Rinderserumalbumin	67

^aFa. Pharmacia GmbH, Freiburg

2.9.6 Silberfärbung (BLUM et al., 1987)

Die Silberfärbung ist eine sehr empfindliche Färbemethode, da selbst geringe Mengen an Protein nachgewiesen werden können. Folgende Schritte wurden durchgeführt:

1. Mindestens 1 h Inkubation in Fixiererlösung
2. 3 x 1 min waschen in 50 % Ethanol (v/v)
3. 1 min Inkubation in Thiosulfatlösung
4. 3 x 10 sec waschen mit $H_2O_{\text{bidest.}}$
5. 20 minütige Inkubation in Imprägnierlösung
6. 2 x 10 sec waschen mit $H_2O_{\text{bidest.}}$
7. Behandlung mit Entwicklerlösung, bis die Banden im Gel deutlich sichtbar sind
8. 2 x 10 sec mit $H_2O_{\text{bidest.}}$ waschen
9. Inkubation in Stopplösung bis eine leichte Trübung sichtbar wird
10. Mindestens 15 min in $H_2O_{\text{bidest.}}$ waschen

Die Gele wurden in Plastikfolie eingeschweißt und sofort mit Hilfe eines Scanners dokumentiert, da die Gefahr des Nachdunkelns bestand. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Fixiererlösung:

Methanol	500 ml
Eisessig	120 ml
Formaldehyd (37 % [v/v])	0,5 ml
$H_2O_{\text{bidest.}}$	ad 1000 ml

Thiosulfatlösung:

$Na_2S_2O_3 \times 5 H_2O$	0,2 g
$H_2O_{\text{bidest.}}$	ad 1000 ml

Lagerung bei 4 °C

Imprägnierlösung:

$AgNO_3$	2 g
Formaldehyd (37 % [v/v])	0,75 ml
$H_2O_{\text{bidest.}}$	ad 1000 ml

Lagerung bei 4 °C

Entwicklerlösung:

Na ₂ CO ₃	60 g
Formaldehyd (37 % [v/v])	0,5 ml
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O	4 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

Lagerung bei 4 °C

Stopplösung:

EDTA	18,6 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

pH 7 - 8 mit NaOH eingestellt

2.9.7 Coomassie-Färbung (Weber und Osborn, 1969, mod.)

Die SDS-Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese kurz mit H₂O gespült und dann für 20 min in der Färbelösung auf einer Wippe gefärbt. Nach Spülen mit Wasser wurde das Gel in Entfärbelösung, welche mehrmals erneuert wurde, geschwenkt, bis der Hintergrund des Gels farblos war. Die fertigen SDS-Gele wurden nach der Dokumentation, mit Entfärbelösung in Folie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

Färbelösung:

Serva Blau G 250	0,1 % (w/v)
Methanol, 100 % (v/v)	250 ml
Essigsäure, 100 % (v/v)	35 ml
H ₂ O _{demin.}	ad 500 ml

Entfärbelösung:

Methanol, 100 % (v/v)	330 ml
Essigsäure, 100 % (v/v)	100 ml
H ₂ O _{demin.}	ad 1000 ml

2.10 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Für die Anzucht von *E. coli*-Mutanten wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3), verwendet, in den sowohl pET- wie auch pASK-IBA-Vektoren transformiert wurden. Als Expressionsvektoren für die heterologe Genexpression der verschiedenen Untereinheiten in dem *E. coli* Stamm BL21 dienten pET-21c, pASK-IBA3 und pASK-IBA5.

2.10.1 Heterologe Expression mit dem pET-System

In den Vektor pET-21c (s. Abb. 2) wurde das Gen *fqoF* kloniert. Dieser Vektor besitzt das T7-Polymerase/Promotor-System. Eine genaue Charakterisierung des Vektors ist in Kapitel 3.1.1.3. zu finden. Von geeigneten *E. coli*-Mutanten, die das gewünschte Plasmid durch Elektroporation (s. 2.7.4) aufgenommen hatten, wurde eine Einzelkolonie gepickt, eine Vorkultur (4-500 ml) angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Für die eigentliche Expression wurden mit der Vorkultur 500 ml bis 10 l MI-Medium (s. 2.2.1.4) angeimpft, das mit Ampicillin, Riboflavin und Eisenammoniumcitrat komplementiert wurde (s. 2.2.6). Bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 wurde die Kultur mit IPTG (s. 2.2.6) induziert und nach einer Induktion über Nacht geerntet.

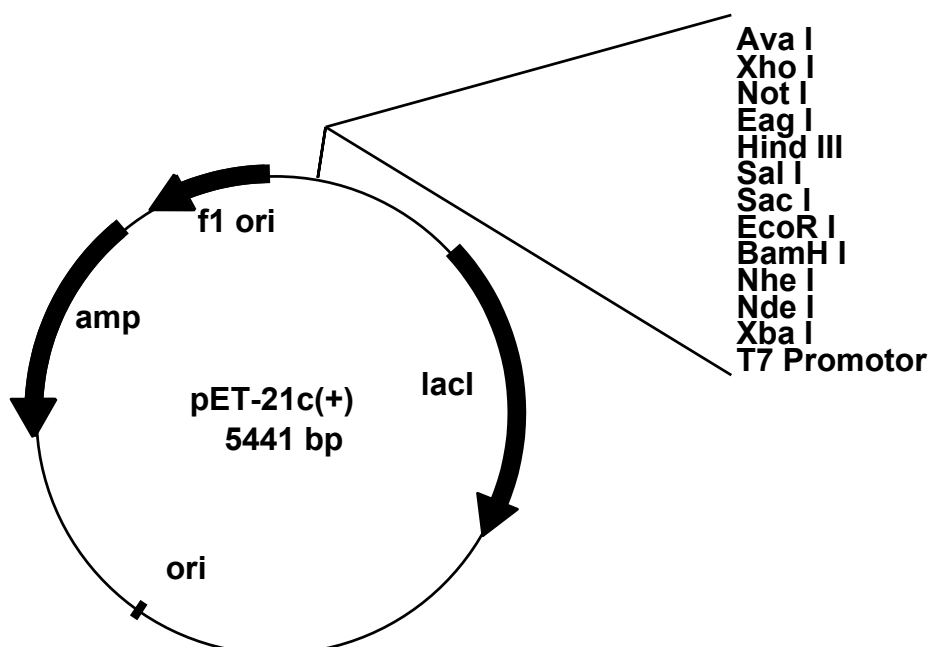


Abb. 2: Vektor pET-21c mit MCS zur Klonierung des *fqoF* Gens

2.10.2 Heterologe Expression mit dem Strep-Tag-System

In den Vektor pASK-IBA3 und pASK-IBA5 wurden über die MCS die Gene *fpoO* (IBA3), *fpoF* (IBA5) und *fpoF* (IBA5) kloniert. Von geeigneten *E. coli*-Mutanten, die das gewünschte Plasmid durch Elektroporation (s. 2.7.4) aufgenommen hatten, wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit eine Vorkultur (250 ml) angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Für die Überproduktion wurden mit der Vorkultur 10 Liter MI-Medium (s. 2.2.1.4) angeimpft, das mit Ampicillin, Riboflavin und Eisenammoniumcitrat komplementiert wurde (s. 2.2.6). Bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 wurde die Kultur mit AHT (s. 2.2.6) induziert und nach einer Induktion über Nacht, geerntet.

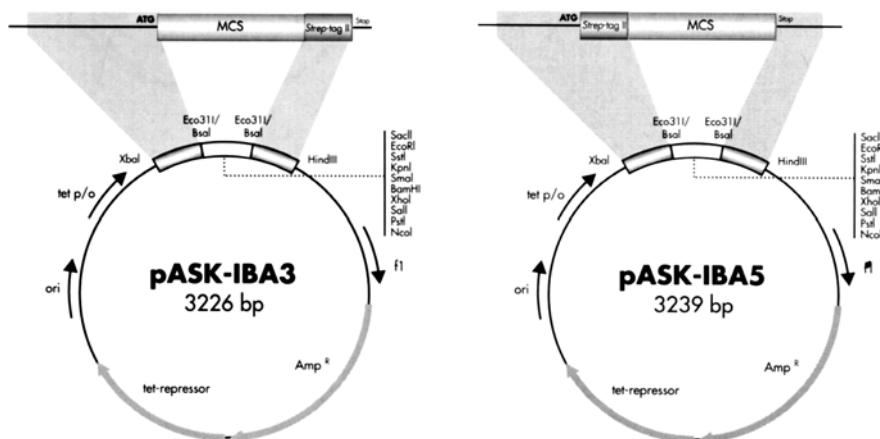


Abb. 3: Vektor pASK-IBA3 und pASK-IBA5

2.11 Zellernte und Zellaufschluß

2.11.1 Zellaufschluß mit der French Pressure Cell

Die Zellen wurden mit einer Durchflusszentrifuge bei 4 °C und 15000 Upm (10 l/h) geerntet. Das Pellet wurde in Tris/NaCl Puffer (50 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Diese Waschschritte wurden bei Bedarf mehrmals wiederholt. Nach dem Waschen, wurde das Pellet in etwa 1 ml Puffer pro Gramm Naßgewicht gründlich

resuspendiert und eine Spatelspitze DNase zugegeben. Der Zellaufschluß geschah in einer gekühlten Druckzelle (American Instrument Co., Silver Spring, USA) mit 6,9 MPa (1000 PSI). Falls notwendig wurden mehrere Passagen durchgeführt. Der Zellaufschluss wurde mikroskopisch kontrolliert. Es schloss sich eine Zentrifugation (14000-16000 Upm; 20 min) zur Entfernung der Zelltrümmer an. Bei dem so gewonnenen Überstand handelte es sich um den Protein-Rohextrakt.

2.11.2 Zellaufschluß durch Ultraschall

Die Zellen wurden wie unter 2.11.1 geerntet und in Puffer aufgenommen. Der Aufschluß der Zellen (auf Eis) geschah jedoch unter Verwendung einer Ultraschallsonde (Ultraschallprozessor UP 200s, Dr. Hielscher GmbH; Amplitude variabel, Cycle 0,5; 8 min).

2.12 Reinigung von Proteinen

Die Chromatographie wurde mittels eines ÄKTA Explorers (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) durchgeführt. Bevor die Chromatographien begannen, mußten die Schläuche mit den jeweiligen Puffern gespült werden.

2.12.1 Hitzefällung

Die heterolog produzierten Untereinheiten von *A. fulgidus* bildeten zusammen mit den *E. coli*-Proteinen nach dem Zellaufschluß den Rohextrakt. Um *E. coli*-Proteine abzutrennen, konnte im Fall der *A. fulgidus* Proteine eine Hitzefällung durchgeführt werden. Dazu wurde die Proteinlösung für 20 min auf 70 °C bis 75 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis für 10-15 min wurde die Lösung für 15 min bei 8000 Upm zentrifugiert, wonach sich die hitzestabilen Proteine im Überstand befanden.

2.12.2 Chromatographie an Strep-Tactin

Das Strep-Tag Aufreinigungssystem basiert auf der hoch selektiven Bindung von Strep-Tag II Fusionsproteinen an Strep-Tactin. Es wurde eine K9/20-Säule (Fa. Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) mit 15 ml Strep-Tactin-Lösung (50 %ig, Fa. IBA, Göttingen) am ÄKTA-Explorer gepackt, wobei Puffer W (100 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl) zum Spülen und anschließend Äquillibrieren genutzt wurde. Die Fusionsproteine wurden in möglichst wenig Puffer W aufgenommen und hochtourig (10000 Upm für 20 min) abzentrifugiert, um

eventuelle unlösliche Rückstände abzutrennen. Der Überstand konnte dann mit 2 ml/min auf die Säule aufgetragen werden. Danach wurde so lange mit Puffer W gespült, bis sämtliches ungebundenes Protein von der Säule gewaschen war. Um die Bindung der Fusionsproteine über den Strep-Tag II an das Strep-Tactin des Säulenmaterials zu lösen, wurde dann mit Puffer E (Puffer W + 2,5 mM Desthiobiotin) gespült, bis sämtliche Fusionsproteine von der Säule entfernt worden waren. Dabei wurde der Strep-Tag II von der Bindestelle am Strep-Tactin von dem im Puffer E enthaltenen Desthiobiotin verdrängt. Zur Regeneration der Säule mußte anschließend mit Puffer R (Puffer W + 1 mM HABA) das Desthiobiotin entfernt werden. War die Säule vollständig mit HABA gesättigt, nahm sie eine dunkelrote Färbung an. Um den Zyklus zu beenden, wurde das HABA mit Puffer W entfernt. Daraufhin war die Säule für eine neue Aufreinigung bereit. Sie wurde bei 4 °C gelagert.

2.12.3 Affinitätschromatographie an Hydroxylapatit

Zur Chromatographie an Hydroxylapatit (DNA Grade Bio-Gel HTP Gel, Bio-Rad, München) wurde der ÄKTA Explorer in Verbindung mit einer XK26/20-Säule benutzt. Das Material wurde 2 Stunden bei einer Flussrate von 2 ml pro Minute gepackt. Anschließend wurde das Material mit 5 Säulenvolumen äquilibriert, wobei Tris-Puffer (100 mM Tris, 5 mM Chaps, pH 7,5) verwendet wurde. Zur Elution diente ein Tris-Kaliumphosphat-Puffer von 0 M bis 1 M Kaliumphosphat (KP-Puffer). Der Puffer setzte sich aus K_2HPO_4 und KH_2PO_4 in Konzentrationen von jeweils 0,5 M zusammen. Aufgetragen wurde zumeist hitzegefällter Rohextrakt, wobei der Chapsgehalt jeweils auf 5 mM eingestellt wurde, da das Protein sonst irreversibel an das Chromatographiematerial band. Nach Beendigung der Chromatographie wurde die Säule zur Konservierung mit 20 % Ethanol gespült und bei 4 °C gelagert.

2.12.4 Größenausfluß-Chromatographie (Gelfiltration) mit Superdex 200®

Bei dieser nicht-adsorptiven Methode erfolgt die Trennung der Proteine aufgrund ihrer Größe. Größeren Molekülen steht ein vergleichsweise kleineres Verteilungsvolumen in der jeweiligen Gelmatrix zur Verfügung, so dass sie früher als kleinere Proteine eluieren.

Für die Gelfiltration wurde eine Superdex 200 High Load XK16/60 bzw. eine XK26/90 Säule verwendet. Empfohlen wird für diese Säulen eine Flußrate von 10-50 cm/h bei maximal 0,3 MPa Rückdruck. Mit diesem Gelmaterial lassen sich Proteine zwischen 10 und 600 kDa

trennen. Die Gelfiltration diente hauptsächlich zum Umpuffern der schon aufgereinigten Proteine.

2.12.5 Molekularmassenbestimmung von Proteinen mit der Größenausschluß-Chromatographie

Da das Elutionsvolumen mit der Größe des jeweiligen Proteins korreliert, kann die Gelfiltration nicht nur als Reinigungsschritt, sondern auch zur Molekülmassenbestimmung herangezogen werden. Hierzu ermittelt man den Verteilungs-koeffizienten K_{av} eines Proteins nach folgender Gleichung:

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

V_t = gesamtes Säulenvolumen
 V_o = Ausschlußvolumen der Säule
 V_e = Elutionsvolumen des Proteins

Durch Kalibrierung der Gelfiltrationssäule mit Eichproteinen (Gel-Filtrations Standard der Firma Bio-Rad), Ermittlung des jeweiligen Verteilungskoeffizienten und Auftragung des dekadischen Logarithmus der Molekularmasse gegen den K_{av} -Wert erhält man eine Eichgerade, aus der man die Molekularmasse eines beliebigen Proteins anhand seines Verteilungskoeffizienten errechnen kann.

2.13 Reinigung von F_{420}

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der $F_{420}H_2$:Heterodisulfid Oxidoreduktase oder der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase an Membranen mußte der physiologische Elektronenüberträger F_{420} aus geeigneten Cytoplasmafraktionen, die bei Membranpräparationen von methanogenen Archaea anfielen, gereinigt werden. Die Reinigung des Cofaktors F_{420} wurde im wesentlichen nach der von BRAKS (1995) beschriebenen Methode durchgeführt, wobei folgende Modifikationen vorgenommen wurden: Es wurden die bei der Herstellung von Membranfraktionen anfallenden Cytoplasmafraktionen im doppelten Volumen Aceton aufgetaut und anschließend 30 min gerührt. Die dabei ausfallenden Proteine wurden in Polypropylenbechern im GS3-Rotor bei 10000 x g für 10 min abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde im gleichen Volumen mit Tris-Puffer (50 mM; pH 7,5) verdünnt und auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte Resource-Q-Säule (XK 26/20, Betthöhe 6 cm) mit 30 ml/min gegeben. Nach dem Spülen der Säule mit Tris-Puffer erfolgte die Elution der

gebundenen Komponenten mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 N bis 1 N in 500 ml. Der F_{420} -Gehalt der Fraktionen wurde durch eine Aufnahme von Spektren von 200 nm bis 600 nm bestimmt. F_{420} -haltige Fraktionen wurden vereinigt, mit Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnt und nochmals auf die Resource-Q-Säule aufgetragen, die jedoch zuvor mit 5 mM HCl äquilibriert wurde. Nach dem Spülen der Säule mit 5 mM HCl wurden gebundene Komponenten mit 50 mM HCl eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mit 1 N NaOH neutralisiert und der F_{420} -Gehalt durch Spektren stichprobenartig überprüft. Die vereinigten Fraktionen wurden mit HCl auf pH 1,0 titriert und auf eine XAD 4 (XK26/20)-Säule gegeben, die zuvor mit 0,1 N HCl äquilibriert worden war. Nach dem Spülen der Säule mit 1 N HCl wurden die gebundenen Komponenten mit 100 % Methanol eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mit 1 N NaOH neutralisiert und nur diejenigen Fraktionen weiterbenutzt, die einen schulterfreien Peak bei 420 nm und möglichst geringe Absorption im Bereich von 280 nm zeigten. Alle übrigen Fraktionen wurden auch vereinigt und für die nächste Präparation aufbewahrt. Die geeigneten Fraktionen wurden vereinigt, mit 1 N NaOH auf pH 7 gebracht und daraufhin am Rotationsverdampfer auf wenige ml eingengt.

2.14 Optisch-enzymatische Aktivitätsbestimmungen

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde der unter 2.2.5.1 angegebene anaerobe Waschpuffer verwendet. Die Küvetten und Stopfen wurden jeweils markiert und nur für die Messung einer bestimmten Enzymaktivität benutzt, da schon Spuren anderer Elektronenakzeptoren die Werte verfälschten. Bestand zusätzlicher Bedarf an Küvetten für eine Aktivitätsbestimmung, wurden sie mit Chromschwefelsäure für 15 min inkubiert, ausgewaschen und mit neuen Stopfen versehen.

2.14.1 Reduktion des F_{420}

200 μ l einer F_{420} -Stammlösung (ca. 2 mM) wurde in ein, mit einem Gummistopfen verschließbares 1 ml Glasgefäß gefüllt und mit N_2 übergast. Nach Zugabe einer Spatelspitze KBH_4 erfolgte die Reduktion von F_{420} zum farblosen, nicht fluoreszierenden $F_{420}H_2$. Die Lösung wurde mit 6 N HCl auf pH 1 eingestellt, um überschüssiges KBH_4 abzufangen. Anschließend erfolgte eine Neutralisierung mit 6 N NaOH auf pH 7,0. Das Glasgefäß wurde mit einem Kautschuk-Stopfen verschlossen und weitere 10 min mit N_2 durchgast. Die HCl und NaOH-Lösungen wurden vorher mit N_2 durchgast und mit 1 μ l Titan-(III)-Citrat/ml reduziert.

2.14.2 Bestimmung der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase-Aktivität

Zunächst wurde am Kontron-Photometer mit angeschlossenem Schreiber das Verhältnis von Extinktion zur Schreiberbreite auf 0,2 E/Vollausschlag eingestellt. Der Schreibervorschub wurde auf 1 cm/min eingestellt und mußte bei hohen Aktivitäten auf 5 cm/min erhöht werden. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 420 nm, da dort der Unterschied der Extinktion des F₄₂₀ zwischen reduzierter und oxidiertes Form am größten ist ($\epsilon = 40 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Das benutzte Photometer verfügte über einen heizbaren Küvettenschlitten für 6 Küvetten, dessen automatische Vorschubfunktion für diese Messung deaktiviert werden mußte. Die Bestimmung der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase-Aktivität erfolgte in 1,4 ml Glasküvetten, die durch Butylgummistopfen verschlossen waren. Sie wurden mit N₂ für ca. 5 min durchgast, indem eine Kanüle zur Begasung eingeführt wurde, während eine zweite zur Entgasung diente. Anschließend wurde 1 ml anaerober Waschpuffer mit einer Glasspritze eingefüllt, die zuvor in einer anaeroben Waschpufferlösung gespült worden war. Vor der Messung der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase-Aktivität wurde der Küvetteninhalt durch Zugabe von 0,5 µl Titan-(III)-Citrat-Lösung (s. 2.2.4) nochmals stark reduziert. Anschließend erfolgte die Zugabe von F₄₂₀H₂ bis zu einer Endkonzentration von 20 µM im Testansatz. Die Küvette wurde in das Photometer gestellt und eine Nullwert Eichung vorgenommen. Anschließend wurde die Proteinprobe, deren Aktivität zu bestimmen war, in die Küvette eingespritzt und die Grundrate durch Starten des Kinetik-Programms des Photometers gemessen. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von Methylviologen (150 mM) und Metronidazol (150 mM). Anschließend wurde die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit aufgezeichnet, aus deren Steigung die Aktivität zu errechnen war.

2.15 Spektralphotometrische Untersuchungen

2.15.1 Dioden-Array-Photometer

Zur Aufnahme von Wellenlängenscans über einen längeren Zeitraum wurde das computergestützte Dioden-Array-Photometer TIDAS-Mikroskop-Spektrometer mit der Software SPECTRALYS der Firma J&M benutzt. Damit war es möglich, dreidimensionale Spektren aufzunehmen. Das ist dann von Vorteil, wenn man Redox-Reaktionen aufzeichnen möchte, bei denen man entweder nicht weiß, bei welcher Wellenlänge Änderungen sichtbar sind oder wenn Veränderungen bei mehreren Wellenlängen gleichzeitig stattfinden. Mit Hilfe

des Computers ließen sich später einzelne Wellenlängen oder Zeitpunkte aus dem Gesamtskan darstellen.

2.15.2 Aufnahme von UV-Vis-Spektren der Untereinheiten FpoF und FqoF in oxidierter und reduzierter Form

Zur Reduktion der F-Untereinheiten wurde in N₂ übergaste Quarz-Küvetten eine Spatelspitze Platin-IV-Oxid gegeben, nochmals mit N₂ begast und anschließend 980 µl anaeroben Tris/NaCl Puffer und 20 µl der Proteinlösung (500 µM) zugegeben. Die Küvetten wurden mit Silikonstopfen verschlossen und für etwa 3-5 min mit H₂ begast und anschließend für weitere 30 Minuten zur Reduktion inkubiert. Die Messung des Spektrums erfolgte im Dioden-Array-Photometer mit einer Integrationszeit von 20 ms über einen Wellenlängenbereich von 200-700nm.

Es wurde das Spektrum des reduzierten Proteins als Referenz verwendet, um dann nach Oxidation mit Luftsauerstoff die Veränderungen im Absorptionsspektrum über zwei Stunden zu verfolgen. Zusätzlich wurde auch die Änderung des Spektrums während der Reduktion verfolgt.

2.15.3 UV-Vis spektroskopische Konzentrationsbestimmung von FAD

Die Bestimmung des Flavingehalts erfolgte nach einer Denaturierung der Protein-Proben mit 3 %iger TCA-Lösung oder durch eine 10-minütige Hitzebehandlung bei 80 °C. Anschließend wurden die Proben bei 15000 Upm zentrifugiert und der Überstand diente zur spektroskopischen Bestimmung der Flavinkonzentration. Die Berechnung erfolgte anhand des in der Literatur angegebenen Extinktionskoeffizienten von 11,3 mM⁻¹ cm⁻¹ für freies FAD bei 445 nm (WHITBY, 1953).

2.15.4 Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen

Der Nicht-Häm-Eisen-Gehalt wurde kolorimetrisch nach der Methode von FISH 1988 nachgewiesen. Das Fe³⁺ wurde mit saurer Kaliumpermanganat-Lösung aus dem Protein gelöst und mit Ascorbinsäure zu Fe²⁺ reduziert, um so den Ferrozin-Komplex, der bei 562 nm absorbiert, zu bilden. Die Lösungen wurden jeweils frisch angesetzt:

Lösung A: 2,25 %ige Kaliumpermanganat-Lösung in 0,6 M HCl

Lösung B: 6,5 mM Ferrospectral (3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonat)-1,2,4- Triazin, Dinatriumsalz), 13,1 mM Neocuproin (2,9-Dimethyl-1,10-Phenanthrolin), 2 M Ascorbinsäure und 5 M Ammoniumacetat.

200 µl Lösung A wurden mit 400 µl Probe oder Standardlösung (0,1-2 µg Fe³⁺) gemischt und für 2 h bei 60 °C inkubiert. Die Probe wurde dann auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 40 µl Lösung B versetzt. Nach weiteren 30 min Inkubation bei Raumtemperatur konnte dann die Absorption bei 562 nm bestimmt werden. Die Eichgerade wurde mit einer FeCl₃-Lösung erstellt.

2.15.5 Bestimmung von säurelabilem Schwefel

Die Eisen-Schwefel-Zentren der Proteine wurden mit Essigsäure hydrolysiert und der Schwefel als Sulfid freigesetzt. Das Sulfid wurde als Zinksulfid gebunden und in Anwesenheit von Fe³⁺-Ionen mit N,N'-Dimethyl-1,4- phenylendiammoniumdichlorid zu Methylenblau umgesetzt (CLINE, 1969; BEINERT, 1983). Methylenblau besitzt ein Absorptionsmaximum bei 670 nm und kann somit photometrisch zur quantitativen Bestimmung des Schwefels herangezogen werden. Alle verwendeten Lösungen wurden in H₂O (HPLC grade) angesetzt. Die Eichgerade wurde mit einer frisch angesetzten Na₂S-Eichlösung erstellt

Test Lösungen:

Lösung A: 2 % Zinkacetat-Lösung

(0,4 g Zinkacetat + 20 µl Eisessig in 20 ml quartzdest. H₂O)

Lösung B: 0,2 % N,N'-Dimethyl-p-phenylendiammoniumchlorid-Lösung in 3,75 M H₂SO₄

(20 mg DMPD + 2 ml H₂SO₄ (98 %, suprapur) + 8 ml quartzdest. H₂O)

Lösung C: 10 % NH₄Fe(SO₄)₂ x 12 H₂O

(2 g NH₄Fe(SO₄)₂ x 12 H₂O + 0,4 ml H₂SO₄ (98 %, suprapur) in 20 ml Quarzdest. H₂O)

Zu 100 µl der Lösung A wurden 100 µl der Probe bzw. des Sulfidstandards (0-25 nMol S²⁻) vorsichtig hinzugegeben. Lösung B und Lösung C wurden im Verhältnis von 20:1 gemischt, und dann je 100 µl zum Reaktionsansatz zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei

Raumtemperatur wurde der Ansatz auf 1 ml mit Wasser aufgefüllt und die Absorption bei 670 nm ermittelt.

2.16 EPR-Spektroskopie

Stellt man sich eine paramagnetische Substanz vor, welche über freie, ungepaarte Elektronen verfügt (Spin $S = \frac{1}{2}$), so sind deren Spins bei Abwesenheit eines Magnetfeldes zufällig orientiert und befinden sich alle auf dem gleichen Energieniveau. Wird die Probe nun einem Magnetfeld (H) ausgesetzt, so wird sich das magnetische Moment des Spins entweder parallel oder antiparallel zur Richtung des induzierten Magnetfeldes ausrichten (Zeeman Splitting). Daher teilen sich die Spins der Probe in zwei Populationen (Boltzmannverteilung), mit der Energie $-(\frac{1}{2}) g \beta H$ und $+(\frac{1}{2}) g \beta H$ ($\beta =$ Bohr'sche Magneton) auf. Die höheren und niedrigeren Energieniveaus korrespondieren mit den Spins, die sich parallel oder antiparallel zu dem induzierten Magnetfeld befinden. Bei der EPR beobachtet man nun die Resonanz Übergänge zwischen diesen beiden Spin-Populationen. Die Energie-Differenz (ΔE) zwischen diesen beiden Spin-Zuständen ist abhängig von der Stärke des angelegten Magnetfeldes (H). Wird diesem System nun eine Mikrowelle mit der Energie $h\nu$ (h ist die Planck'sche Konstante und ν die Frequenz der Mikrowelle) zugefügt und das Magnetfeld variiert, kommt es zu einem Resonanz Übergang, wenn die Energie-Differenz (ΔE) zwischen den beiden Spin-Zuständen ($(\frac{1}{2}) g \beta H$) gleich $h\nu$ ist. Diese Gleichung ($\Delta E = h\nu = g \beta H$) hat zwei Variablen, die Mikrowellenfrequenz (ν) und die Stärke des Magnetfeldes H . Man erhält für gewöhnlich ein EPR-Spektrum, indem man das Magnetfeld moduliert, um so die Resonanz Bedingung mit einer festen Mikrowellen Frequenz zu finden. Die am häufigsten verwendete Mikrowellen Frequenz ist 9 GHz, auch X-Band genannt. Da die EPR sehr schwache Energie Absorptionen detektiert, geschieht die Modulation des Magnetfeldes bei einer Frequenz von 100 khz. Die EPR-Spektren werden als erste Ableitung der Absorptions-Kurve aufgenommen. Da sich die Frequenz (ν) von Experiment zu Experiment ändern kann, ist es besser die Signal-Position mit einem konstanten Wert zu beschreiben. Bei der EPR dient hierzu der g-Wert ($g = h\nu/\beta H$). Der g-Wert eines freien Elektrons beträgt $g_e = 2,0023$. Da die meisten Elektronen in Eisen-Schwefel-Zentren in einem 3D Molekül-Orbital von Übergangs-Metall-Ionen lokalisiert sind, weicht ihr g-Wert von dem, des freien Elektrons ab. Diese Abweichung spiegelt die elektromagnetische Interaktion des Spin-Systems mit seiner Umgebung wieder. Der g-Wert eines paramagnetischen Zentrums kann bis zu drei Werte annehmen (siehe Abb. 4). Jeder g-Wert korrespondiert mit einem Wert, der erhalten wird, wenn sich das Magnetfeld

H parallel zu einer der drei Ausrichtungen des Moleküls befindet. Diese g-Werte werden mit g_x , g_y und g_z bezeichnet. Sind die Spins des Moleküls magnetisch isotropisch, so nimmt der g-Wert nur einen Wert an ($g_x = g_y = g_z$). Bei einer axialen Symmetrie ist die Signal-Position gegeben durch zwei g-Werte ($g_x = g_y < g_z$) und bei einer rhombischen durch drei g-Werte ($g_x \neq g_y \neq g_z$).

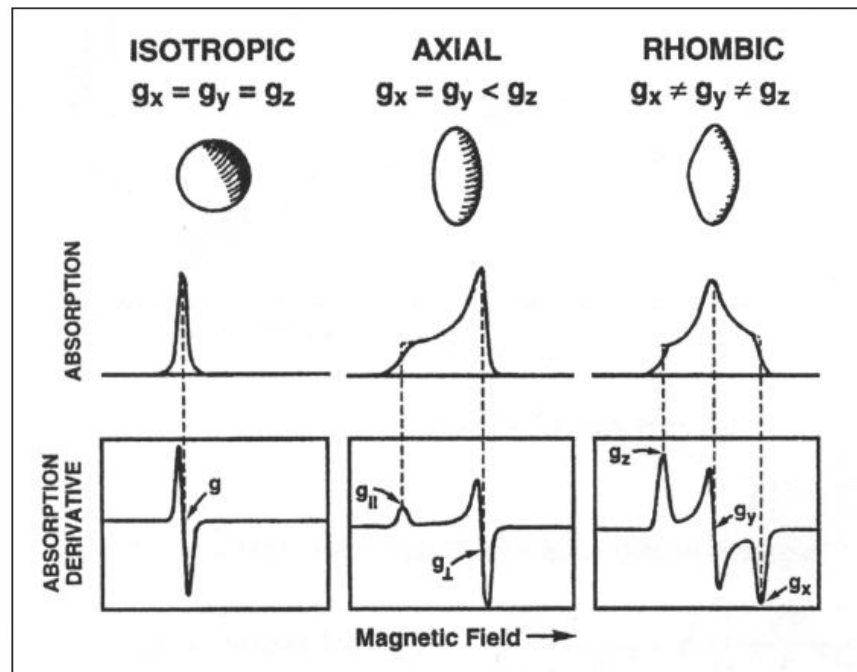


Abb. 4: Schematische Darstellung der Form des magnetischen Moments eines paramagnetischen Zentrums, g-Werte und ihre EPR spektrale Linienform (aus OHNISHI, 1998)

Die EPR-Spektren wurden mit einem Bruker EMX 1/6 EPR Spektrometer, bestückt mit einem Standard TE102 Resonanzkörper für X-Band (~9 GHz) Messungen, aufgenommen. Die Temperatur im Bereich von 13 bis 300 K wurde mit einem Oxford Instruments ESR9 Helium-Fluss Kryostaten, reguliert und durch eine ITC4 Temperatur-Einheit erhalten. Aufnahmen in flüssigem Stickstoff (77 K) wurden mit einem Fingerdewar aus hochreinem Quarz durchgeführt. Alle Proben wurden in Quarzröhrchen (99,9 %), mit einem Innendurchmesser von 3-4 mm und einer Wandstärke von ca. 0,5 mm, gefüllt. Dazu wurden Hamilton Spritzen mit langen Kanülen verwendet. Das Einfrieren und die Lagerung der Proben wurde in flüssigem Stickstoff bei 77 K durchgeführt. Die Aufnahme der EPR-Spektren erfolgte mit dem oben beschriebenen Spektrometer.

Die erhaltenen EPR-Spektren wurden mit dem Programm WINEPR, Version 2.11 (Bruker) ausgewertet. Die Berechnung des g -Faktors ergibt sich aus der Resonanzbedingung:

$$h \cdot \nu = g \cdot \beta \cdot H$$

$h = 6,6262 \cdot 10^{-34}$ J s (Planck Konstante)

$\beta = 9,274096 \cdot 10^{-24}$ J T⁻¹ (Bohr Magneton)

ν = Mikrowellenfrequenz in s⁻¹

H = Magnetfeld in T

2.17 Kristallisationsexperimente

Die Kristallisationsexperimente mit der FqoF und der FpoF Untereinheit wurden ausschließlich mit der „sitting drop“ Vapor-Diffusions-Methode durchgeführt (siehe 3.4). Die Kristallisations-Schalen (Cryscem 24 Loch Platten) wurden bei 4, 20 und 30 °C in klimatisierten Kristallisationsräumen inkubiert. Zum Einsatz kamen die kommerziell erhältlichen Hampton Crystal Screen Kit I und II sowie der PEG-ION Screen I und II. Zusätzlich wurden zahlreiche selbstangesetzte Screens verwendet. Die Stammlösungen der Einzelkomponenten dieser Screens wurden steril filtriert und erst unmittelbar in den Schalen zusammengefügt. Sah eine Pufferbedingung vielversprechend aus wurde um diese Bedingung gescreent. Das Puffer-Reservoir betrug 0,5 - 1 ml. Zumeist wurde 1µl Mutterlösung mit 1µl Protein (10 bis 30 mg/ml) gemischt. Das Verhalten des Proteins in den jeweiligen Puffern wurde sofort protokolliert und dann in regelmäßigen Abständen erneut beobachtet. Im Folgenden sind die verwendeten selbstangesetzten Pufferbestandteile aufgeführt.

Puffer zur Einstellung des pH-Wertes

0,1 M Zitronensäure	pH 4
0,1 M Natriumacetat	pH 5
0,1 M MES	pH 6; pH 6,5
0,1 M HEPES	pH 7; pH 7,5
0,1 M Tris	pH 8; pH 8,5
0,1 M Bicine	pH 9

Die Stammlösungen wurden 1 M angesetzt.

Präzipitations-Mittel

Präzipitant	Konzentration im Ansatz
Polyethlen Glykol (PEG) mit Molekulargewichten von 1500-20 000	10-30 % v/v
Isopropanol	0,5-2 % v/v
2-Methyl-2,4-Pentandiol (MPD)	10-70 % v/v
Ammoniumsulfat	0,2-4 M
Ammoniumfluorid	0,2 M
Lithiumsulfat	0,2 M
Magnesiumsulfat	0,2 M
Magnesiumnitrat	0,2 M
Natriumsulfat	0,2 M
NaCl	0,2-5 M
Kaliumsulfat	0,1-0,3 M
Kaliumformiat	0,2 M
Kaliumacetat	0,2 M
Kaliumnitrat	0,2 M
Kaliumthiocyanat	0,2 M
Di-Kaliumhydrogenphosphat	0,2 M
Kaliumiodid	0,2 M
Rubidiumchlorid	0,2 M

Die Stammlösungen der Salze wurden 2M angesetzt

Additive und Reduktionsmittel

Additive und Reduktionsmittel	Konzentration im Ansatz
Glycerin	5-20%
β -Octylglucosid	0,5%
1,4-Dithio-L-threitol (DTT)	4 mM
F ₄₂₀	20 mM

2.18 Gelretardation von DNA-Protein-Komplexen

Wechselwirkungen zwischen DNA und Proteinen, durch Bildung von Protein-DNA-Komplexen wurden anhand von Gelretardationsexperimenten ('mobility shift') untersucht (Ausubel et al., 1988; modifiziert). Die Versuche wurden mit unmarkiertem Fragment in der nicht-denaturierenden 5% PAGE, als auch im 2% TAE-Agarosegel durchgeführt.

2.18.1 In der nicht-denaturierenden PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen (5 % [w/v] Acrylamid; 16 x 12 cm) mit einer Dicke von 0.5 mm. Das maximale Auftragevolumen betrug 10 µl pro Tasche (5 x 5 x 0,5 mm). Die Glasplatten wurden zuvor mit Binde- bzw. Repellsilan (s. 2.15.3) behandelt. Als Puffersystem diente Tris-Glycin-Puffer.

Gel- und Elektrophorespuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7,4

(5 x Tris-Glycin-HCl-Puffer):

960 mM Glycin

5 mM EDTA

Gellösung (5 % PAGE; 20 ml)

3,2 ml Bisacrylamid-Lsg.(30:0,8)

4,0 ml 5x Tris/Glycin pH 7.4

0,5 ml Glycerin

12,3 ml H₂O bidest.

13,3 µl TEMED

160 µl APS

Zur Bindung des Proteins an die DNA erfolgte eine Inkubation des Bindungsansatzes aerob und anaerob für 5-20 min bei 25 °C.

Bindungsansatz:

unmarkiertes DNA-Fragment (ca. 2 ng) 2 μ l

Kompetitor-DNA (0-2 μ g) 0-2 μ l

Protein (max. 2 μ g) 1-2 μ l

Bindungspuffer ad 10 μ l

Im Anschluß an die Bindungsreaktion, wurden dem Ansatz 3 μ l Beschwerungslösung zugesetzt und dieser bis zur Elektrophorese auf Eis gehalten. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 9 mA bis zum Austreten des Farbmarkers (Bromphenolblau) aus dem Gel oder zur höheren Auflösung bis max. 3 h. Anschließend wurde das Gel gefärbt und im Videosystem dokumentiert.

Bindungspuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.4

10 mM KCl

1 mM EDTA

1 mM DTT

MS-Beschwerungslösung

50 % (w/v) Glycerin

0.02 % (w/v) Bromphenolblau

2.18.2 In Agarosegelen

Eine vereinfachte Form der Gelretardationen wurden in Agarose Minigelen (2 % [w/v] Agarose in TAE-Puffer) durchgeführt. Diese Methode bot die Möglichkeit einer wesentlich beschleunigten, wenn auch im Gegensatz zu den Gelretardationen in der PAGE weniger spezifischen Bestimmung. Die Herstellung des Gels erfolgte wie bei einer Standardgelelektrophorese (s. 2.4.5.1).

10x TAE-Puffer:

400 mM Tris-Acetat, pH 7,8

100 mM Na-Acetat

10 mM EDTA

Zur Bindung der Proteine an die DNA erfolgte eine Inkubation des Bindungsansatzes für 10-20 min bei 25 °C.

Bindungsansatz:

DNA-Fragment (50-100 ng) 2 µl

Kompetitor-DNA (0-2 µg) 0-2 µl

Protein- bzw. Rohextrakt (max. 2 µg) 1-2 µl

Bindungspuffer ad 10 µl

Im Anschluß an die Bindungsreaktion wurden dem Ansatz 3 µl MS-Beschwerungslösung zugesetzt und dieser bis zur Elektrophorese auf Eis gehalten. Die Elektrophorese erfolgte für 1,2 h bei einer konstanten Spannung von 60 V und einer Stromstärke von max. 80 mA, bis der Farbmaler (Bromphenolblau) eine Position ca. 2 cm vor dem Gelende erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und im Videosystem dokumentiert.

2.19 Chemikalien, Biochemikalien und Gase

Standardchemikalien wurden, soweit nicht anders im Text angegeben, mit dem Reinheitsgrad „pro analysis“ oder „reinst“ von den Firmen Boehringer (Mannheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Hannover), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen) verwendet. Die Bezugsquellen weiterer Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien und Kits sind nachfolgend aufgeführt:

Amersham Pharmacia, Freiburg:

NAP-5-Säulen, XK-Säulen, „HMW Calibration-Kit“, „LMW-Calibration“-Kit,

Biomol, Hamburg:

IPTG, Lysozym, Phenol (äquilibriert mit Tris-Puffer), TEMED, X-Gal Coomassie Brilliant blue G250/R 250, DTE, DTT

Biorad, Richmond CA 94804 USA:

Gelelektrophorese-Equipment, Gelfiltrations-Standard-Proteine

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Alkalische Phosphatase, Proteinase K, RNase, T4-DNA-Ligase

Difco Laboratories, Detroit, USA:

Agar

Gerbu Trading GmbH, Gaiberg:

Ampicillin, Kanamycin,

Gibco-BRL, Eggenstein:

Agarose, Hefeextrakt, Trypton

Millipore, Eschborn:

Mikrodialyse-Filter

Oxoid, Basingstone, England:

Agar, Trypton, Hefeextrakt

Promega Corporation, Madison, USA:

„Wizard DNA Purification Kit“

Qiagen GmbH, Hilden:

„Qiaquick Gel Extraction Kit“

Sartorius AG, Göttingen:

Sterilfilter

Serva, Heidelberg:

APS, Acrylamid, Bisacrylamid, BSA, EDTA, Glycin, MOPS, Titan-(III)-Chlorid, Tris, Resazurin, KaBH_4

Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen:

Methylviologen, Metronidazol, Phenazin (-Derivate)

Takara, Japan:

Takara Ex-Taq-Polymerase

Alle Gase sowie flüssiger Stickstoff wurden von der Fa. Messer Griesheim, Kassel, bezogen.

Die Gase waren von folgender Reinheit:

N₂: 99,99 %

N₂-CO₂-Gemisch (80/20), Reinheit nicht angegeben

H₂: 99,9 %

3. Experimente und Ergebnisse

Die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase konnte bisher aus mehreren *Archaea* isoliert werden. Die aufgereinigten Proteine aus *Mt. tindarius* (HAASE et al., 1992), *A. fulgidus* (KUNOW et al., 1994) und *Ms. mazei* Gö1 (ABKEN und DEPPENMEIER, 1997) wurden eingehend charakterisiert. Nach dem damaligen Kenntnisstand setzen sich die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen aus jeweils fünf Untereinheiten zusammen. Die genaue Anzahl der korrespondierenden Untereinheiten der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen konnte mit Hilfe der vollständigen Genomsequenzierungen von *A. fulgidus* (KLENK et al., 1997) und *Ms. mazei* Gö1 (DEPPENMEIER et al., 2002) bestimmt werden. So bestehen die Enzym-Komplexe aus 11-12 Untereinheiten, wobei fast alle Polypeptide hohe Homologien zu Untereinheiten der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase aus Bakterien sowie zu dem Kernenzym des Komplex I der Mitochondrien aufweisen (WEIDNER et al., 1993; YAGI, 1993). Auch die Genomsequenzdaten von *Ms. barkeri* und *Ms. acetivorans*, beide nahe Verwandte von *Ms. mazei*, zeigten eine sehr ähnliche Operonstruktur der Gene, der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase (Joint Genome Institute; <http://www.jgi.doe.gov/>; Whitehead Institute; <http://www.genome.wi.mit.edu/>). Abbildung 5 zeigt einen Vergleich der Genkluster der $F_{420}H_2$:(Mena)chinon-Oxidoreduktase aus *A. fulgidus*, der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase aus *Ms. mazei* Gö1 und der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase aus *E. coli*, mit den Bezeichnungen und Größen der einzelnen Untereinheiten.

Vor einigen Jahren wurden die Gene des Enzyms aus *E. coli* sequenziert. Die Untereinheiten des Proteins erhielten die Bezeichnungen NuoA bis NuoN. Der Name NUO leitet sich von NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase ab (WEIDNER et al., 1993). Das Protein besteht aus 13 Untereinheiten, wobei das zu Grunde liegende Operon eine Gesamtgröße von 15159 bp aufweist. Die Untereinheiten NuoC und NuoD sind auf Genebene fusioniert. Das Operon, das für die entsprechenden Untereinheiten des Enzyms aus *Ms. mazei* Gö1 kodiert, besitzt eine Gesamtgröße von 11000 bp und umfasst 11 Gene. Allerdings muß das *fpoF*-Gen, das an einer anderen Stelle im Genom lokalisiert ist, hier mit einberechnet werden (1044 bp). Das Protein aus *A. fulgidus* wird von elf Genen mit einer Gesamtgröße von 11502 bp kodiert, die alle in dem *fqo*-Operon organisiert sind. In *A. fulgidus* sind die Gene *fqoB* und *fqoC* fusioniert.

Die Operon-Bezeichnungen *fqo* und *fpo* leiten sich von den Namen der Enzyme „ $F_{420}H_2$:quinone-oxidoreductase“ für *A. fulgidus* bzw. „ $F_{420}H_2$:phenazine-oxidoreductase“ für

Ms. mazei Gö1 ab, während bei der Bezeichnung der einzelnen Gene die Nomenklatur der *E. coli* Homologen übernommen wurde. Zehn der elf Untereinheiten des Proteins aus *A. fulgidus* weisen Homologien zu Untereinheiten der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase aus *E. coli* auf. Nur der FqoF Untereinheit ist in *E. coli* kein homologes Protein zuzuordnen. Das FqoF Protein zeigt vielmehr Homologien zu der FrhB-Untereinheit der F₄₂₀-abhängigen Hydrogenase aus methanogenen Archaea (SORGENFREI et al., 1997), zu Ferredoxinen, sowie den 39 kDa Untereinheiten der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *Ml. tindarius* (FfdB; WESTENBERG et al., 1999) und aus *Ms. mazei* (FpoF; BÄUMER et al., 2000). Daher lag die Vermutung nahe, dass diese Untereinheit für die Oxidation des Elektronendonors F₄₂₀H₂ zuständig ist und als Elektronen-einspeisendes Modul der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase dient.

A														
<i>nuo</i>	<i>nuo</i>	<i>nuo</i>	<i>nuo</i>	<i>nuo</i>	<i>nuo</i>	<i>nuo</i>	<i>nuo</i>	<i>nuo</i>	<i>nuo</i>	<i>nuo</i>	<i>nuo</i>	<i>nuo</i>	<i>nuo</i>	
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
16,3	25,1	67,4	18,6	49,6	91,2	36,3	20,4	19,9	11,2	66,3	50,8	51,6		
B														
<i>fqo</i>	<i>fqo</i>	<i>fqo</i>	<i>fqo</i>	<i>fqo</i>	<i>fqo</i>	<i>fqo</i>	<i>fqo</i>	<i>fqo</i>	<i>fqo</i>	<i>fqo</i>	<i>fqo</i>	<i>fqo</i>	<i>fqo</i>	
J	K	M	L	N	A	B	C	D	H	I	F			
16,5	11,3	53,9	72,4	43,2	14,1	39,7	45,0	41,2	28,7	39,0				
C														
<i>fpo</i>	<i>fpo</i>	<i>fpo</i>	<i>fpo</i>	<i>fpo</i>	<i>fpo</i>	<i>fpo</i>	<i>fpo</i>	<i>fpo</i>	<i>fpo</i>	<i>fpo</i>	<i>fpo</i>	<i>fpo</i>	<i>fpo</i>	<i>fpo</i>
A	B	C	D	H	I	J	K	L	M	N	O		F	
14,1	20,7	18,3	42,5	38,0	15,2	18,5	11,3	69,0	53,9	52,7	15,0		39,0	

Abb. 5: Die Gencluster der F₄₂₀H₂-Dehydrogenasen aus *A. fulgidus* und *Ms. mazei* sowie der NADH-Dehydrogenase aus *E. coli*

- A: *nuo*-Gencluster von *E. coli* und die Molekularmassen (kDa) der korrespondierenden Proteine (WEIDNER et al., 1993, modifiziert)
 B: *fqo*-Gencluster von *A. fulgidus* und die Molekularmassen (kDa) der korrespondierenden Proteine (BRÜGGEMANN et al., 2000)
 C: *fpo*-Gencluster von *Ms. mazei* Gö1 und die Molekularmassen (kDa) der korrespondierenden Proteine (BÄUMER et al., 2000)

Der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase aus *E. coli* dient hingegen NADH als Elektronendonator. Dieser Cofaktor verfügt über ein ähnliches Redoxpotential wie F₄₂₀H₂ und stellt ebenfalls einen reversiblen Hydrid-Donor dar. Zur NADH-Oxidation dienen in *E. coli*

die Untereinheiten NuoE, F und G, die zusammen das Elektronen-einspeisende Inputmodul bilden. Die NuoF Untereinheit weist keine Homologien zu den FqoF/FpoF Untereinheiten auf, trotzdem ist die Namensgebung für die Untereinheit aus *A. fulgidus* und *Ms. mazei* Gö1 gerechtfertigt, da eine funktionelle Verwandtschaft besteht und gleichzeitig auf das Substrat F₄₂₀H₂ hingewiesen wird.

Die *fpoF* Gene aus *Ms. mazei* und *Ms. acetivorans* sind nicht in dem *fpo*-Gencluster lokalisiert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass dieses Genprodukt aus *Ms. acetivorans* als Inputmodul fungiert (diese Arbeit; siehe Kapitel 3.2.2.2). Das korrespondierende Protein wird als FpoF bezeichnet, es übernimmt wie FqoF in *A. fulgidus* die Aufgabe der F₄₂₀H₂ Oxidation. In dem *fpo*-Gencluster aus *Ms. mazei* befindet sich ein zusätzliches Gen, das *fpoO*-Gen. Dieses *fpoO*-Gen zeigt keinerlei Homologien zu bekannten Genen und sein Vorkommen scheint auf *Methanosarcina*-Arten beschränkt zu sein. In dem methanogenen Organismus dient im Gegensatz zu Ubichinon bzw. Menachinon in *E. coli* oder Menachinon in *A. fulgidus* (TINDALL et al., 1989) das erst kürzlich entdeckte Methanophenazin als membranintegroaler Elektronenüberträger. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass FpoO eine Rolle bei der Reduktion des Methanophenazin übernimmt, oder dass dieser Untereinheit eine regulatorische Funktion zukommt.

In dieser Arbeit sollten die Untereinheiten FqoF und FpoF sowie FpoO in *E. coli* überproduziert und bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Weiterhin sollte die Funktion und die enthaltenen prosthetischen Gruppen der als „Input Modul“ fungierenden F Untereinheiten bestimmt und Kristallisationsexperimente durchgeführt werden.

3.1 Klonierung

Für die Klonierung der Gene der F Untereinheiten aus *A. fulgidus* und *Ms. mazei* Gö1 kam eine Subklonierung über sogenannte Parkvektoren zum Einsatz. Hierzu wurden die Gene mittels PCR amplifiziert, die Überhänge der PCR-Produkte aufgefüllt und so stumpfe Enden (blunt ends) erzeugt (siehe 2.6.3). Die Parkvektoren wurden dann mit einem Restriktionsenzym geschnitten, das ebenfalls stumpfe Enden erzeugt und anschließend mit dem PCR-Produkt ligiert. Mit Hilfe der PCR wurden Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingefügt die eine Umklonierung in einen Überexpressions-Vektor erlaubten. Im Fall des *fqoF*

Gens aus *A. fulgidus* wurde der Parkvektor pMPMT3 und im Fall des *fpoF* Gens aus *Ms. acetivorans* der Parkvektor pZErO verwendet. Für die Überexpression kamen das pET-System für FqoF und das Strep-Tag-System für das Fqo, FpoF und das FpoO Protein zum Einsatz.

3.1.1 Klonierung des Gens *fqoF* der F₄₂₀H₂-Chinon-Oxidoreduktase aus *A. fulgidus* in *E. coli*

In der Aminosäuresequenz der FqoF Untereinheit befinden sich zwei Bindemotive für tetranukleare Eisen-Schwefel-Zentren, welche hochkonserviert sind. Außerdem findet man ein Bindemotiv für ein FAD. In Vorarbeiten wurde schon gezeigt, dass sich das FqoF Protein in *E. coli* exprimieren lässt, und auch dass alle postulierten Co-Faktoren vorhanden waren (BRÜGGEMANN et al., 2000). Jedoch wurde zur Expression ein Plasmid verwendet (pHB5, siehe Abb. 22), welches neben dem *fqoF* Gen zusätzlich noch ein Fragment des stromaufwärts liegenden Gens *fqoI* trug. Demzufolge führte die Überproduktion mit Hilfe des Plasmids pHB5 dazu, dass zwei weitere Proteine gebildet wurden, die sich chromatographisch nicht abtrennen ließen. Daher sollte in dieser Arbeit nur das *fqoF* Gen mit Start- und Stopp-Codon in den Überexpressionsvektor pET21c kloniert werden, um dieses Problem zu umgehen.

3.1.1.1 Amplifizierung des Gens *fqoF* der F₄₂₀H₂-Chinon-Oxidoreduktase aus *A. fulgidus* mittels PCR

Anhand der bekannten Sequenz des F₄₂₀H₂:Chinon-Oxidoreduktase-Genclusters wurden Oligonukleotid-Paare abgeleitet, die eine DNA-Amplifizierung des *fqoF*-Gens mit Hilfe der PCR ermöglichten. Es kam der Primer *fqoF* fw und der revers orientierte Primer *fqoF* rev (s. Tab. 4) zum Einsatz, wodurch am 5'-Ende eine *NdeI*-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *BamHI*-Schnittstelle durch die PCR eingefügt wurde. Als Matrize diente gereinigte chromosomale DNA (s. 2.4.2) von *A. fulgidus*. Die Amplifikation erfolgte über 25 Zyklen, mit einer Denaturierung von 45 s bei 96 °C und einer Anlagerung der Primer bei 60 °C für ebenfalls 45 s, woran sich die Elongationsphase bei 72 °C für 60 s anschloß. Als DNA-Polymerase diente die ExTaq-Polymerase der Firma Takara, die besonders für die DNA-Amplifikation aus hyperthermophilen Organismen und für große Fragmente geeignet ist. Innerhalb von 30 Zyklen entstand ein Amplifikat der erwarteten Größe von 1044 bp (Abb. 6).

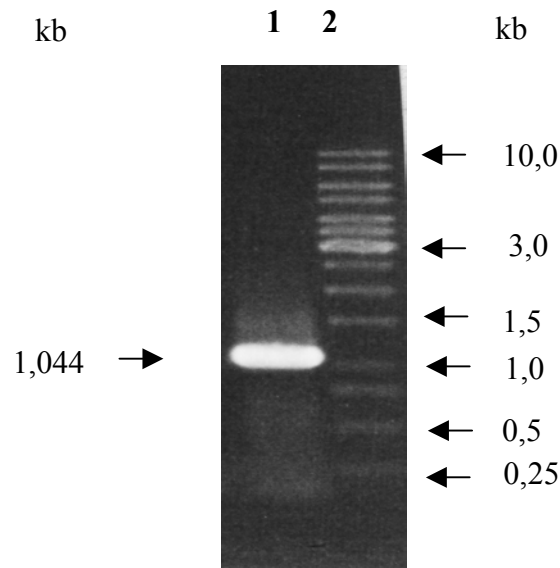


Abb. 6: PCR-Produkt des Gens *fqoF*

Die Fragmente wurden elektrophoretisch in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Spur 1: das 1044 bp-große PCR-Produkt

Spur 2: 1 kb-Ladder

3.1.1.2 Klonierung und Sequenzierung des Gens *fqoF* in pMPMT3

Für die Klonierung des amplifizierten 1,044 kb-Fragments wurde der 3,677 kb große Vektor pMPM-T3 als Parkvektor gewählt, der in großer Kopienzahl in *E. coli* vorliegt. Er kodiert für eine Tetracyclin-Resistenz und erlaubt ein blau weiß Screening (siehe 2.7.5).

Die Klonierung erfolgte über die *SmaI*-Schnittstelle, die in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors lokalisiert ist, durch eine sogenannte „blunt end“ Ligation. Der gesamte PCR-Ansatz wurde hierzu einer Mikrodialyse (s. 2.4.4.3) unterzogen. Anschließend erfolgte das Auffüllen der Überhänge mit Klenow-Enzym und die Phosphorylierung mit Polynukleotidkinase (s. 2.6.3), worauf sich eine weitere Mikrodialyse anschloß. Der Vektor wurde mit *SmaI* geschnitten, mikrodialysiert und dephosphoryliert (s. 2.6.2). Beide Komponenten wurden bei RT für zwei Stunden ligiert (s. 2.6.4) und anschließend in *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert (s. 2.7.3), auf tetracyclinhaltigen Agaroseplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die weißen Kolonien wurden über Nacht in tetracyclinhaltigen LB-Medium angezogen und am folgenden Tag einer Plasmid Präparation (s. 2.4.3.1) unterzogen. Die Plasmide wurden *NdeI*- und *BamHI* verdaut (s. 2.6.1) und gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.4.5.1). Bei dem Doppelverdau sollten zwei Fragmente mit Längen von 3,677 kb und 1,044

kb entstehen. Ein Plasmid, das diese Anforderungen erfüllte, erhielt die Bezeichnung pKH4 (Abb. 7, Spur 5).

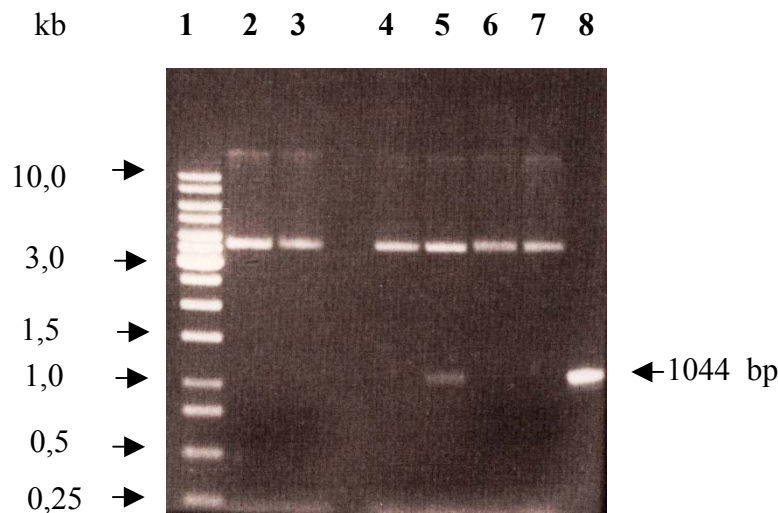


Abb. 7 : Restriktionsverdaue von rekombinanten Plasmiden

Die Ansätze wurden elektrophoretisch in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt
 Spur 1: 1 kb-Ladder
 Spur 2 bis 7: *Bam*HI /*Nde*I-geschnittenes Plasmid der Klone 1 bis 6
 Spur 5: *Bam*HI /*Nde*I-geschnittenes Plasmid aus Klon 4 (pKH4)
 Spur 8: *fgoF* PCR Produkt als Kontrolle

Mit der Sequenzierung des Plasmid pKH4 (s. 2.8) wurde nachgewiesen, dass das Insert korrekt inseriert war und die eingefügten Schnittstellen vorhanden waren.

3.1.1.3. Umklonierung des Gens *fgoF* von pKH4 in pET-21c

Zur Überproduktion des FqoF-Proteins, musste das *fgoF* Gen in einen Über-expressionsvektor umkloniert werden. Der verwendete Vektor pET-21c (Fa. Novagen, Heidelberg) verfügt über verschiedene Merkmale. Zum einen kann zur Überexpression das T7-RNA-Polymerase/Promotorsystem benutzt werden. Dieses System ermöglicht es, Gene mit hoher Effizienz in *E. coli* zu exprimieren. Sowohl die Spezifität der T7-RNA-Polymerase zu dem T7-Promotor (ROSA, 1979; DUNN und STUDIER, 1983), als auch die Aktivität des Promotors aus dem Phagen T7, ist der des bakteriellen Systems überlegen (CHAMBERLIN und RING, 1973; GOLOMB und CHAMBERLIN, 1974). Eine Expression kann jedoch nur in solchen *E. coli*-Stämmen (λ DE3-lysogen) erfolgen, die eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens besitzen. Außerdem enthält der 5,45 kb große pET-Vektor das Gen für die Vermittlung der Ampicillin-Resistenz, eine *lac*-Operator-Sequenz hinter dem T7-

RNA-Polymerase-abhängigen Promotor (DUBENDORFF und STUDIER, 1991) sowie das *lacI*-Gen zur Inhibierung der Expression unter nicht induzierenden Bedingungen. Dadurch wird eine effektive Unterdrückung der basalen Expression gewährleistet. Weiterhin befindet sich eine multiple Klonierungsstelle, eine Shine-Dalgarno-Sequenz und eine T7-Transkriptions-terminatorsequenz auf dem Plasmid. Der Expressionsvektor pET21c bietet aufgrund einer His-Tag^{cc}-Sequenz am 3'-Ende die Möglichkeit einer Aufreinigung eines Fusionsproteins mit Hilfe einer Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie, die jedoch im Fall des FqoF Proteins nicht zur Anwendung kam.

Zur Umklonierung des *fqoF*-Gens aus pKH4 in pET-21c wurden die Plasmide jeweils *NdeI/BamHI* verdaut und anschließend mikrodialysiert (s. 2.4.4.3). Beide Ansätze wurden nach Inaktivierung der Restriktionsenzyme zur Ligation zusammengegeben und über Nacht bei 16 °C ligiert (s. 2.6.4). Danach erfolgte die Transformation in *E. coli* DH5α und anschließend die Ausplattierung auf ampicillinhaltige Agar-Platten. Aufgrund des Markerwechsels von Tetracyclin nach Ampicillin, wurden die Klone selektiert, welche den pET-Vektor trugen. Von zehn ausgewählten Kolonien enthielt eine das Plasmid der richtigen Größe, welches dann als pKH9 bezeichnet wurde. Abbildung 8 zeigt ein Agarosegel des Plasmids pKH9 nach einem Verdau mit zwei Restriktionsenzymen, wobei das Plasmid entsprechend linearisiert oder in zwei Fragmenten vorlag.

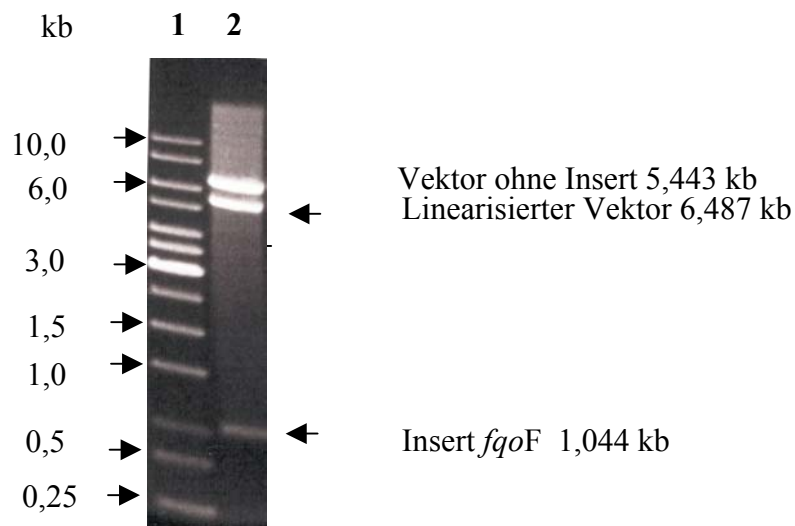


Abb. 8: Restriktionsverdau von pKH9

Die DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt

Spur 1: 1 kb-Ladder

Spur 2: pKH9, *NdeI/ BamHI* -geschnitten

Die Größe des linearisierten Plasmids pKH9 betrug 6,5 kb. Wurde das Plasmid an den flankierenden Schnittstellen des Inserts mit *NdeI* und *BamHI* partiell verdaut, ergaben sich drei Banden. Ein Fragment mit der Größe von 6,5 kb entsprach dem linearisierten Vektor (unvollständiger Verdau), das etwa 1 kb kleinere Produkt dem Vektor pET-21c und die kleinste Bande bei 1,0 kb entsprach dem *fqoF* Insert.

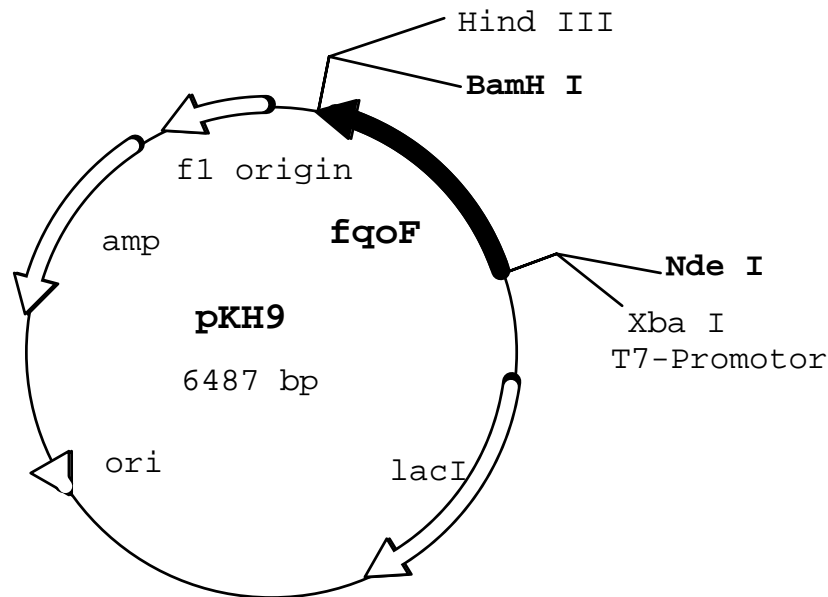


Abb. 9: Physikalische Karte des Plasmids pKH9

entstanden aus der Ligation des 1,044 kb-großen *NdeI/BamHI*-Fragments aus pKH4 mit dem *NdeI/BamHI*-verdauten pET-21c

Mit Hilfe einer Ansequenzierung mit den Sequenzierprimern T7promo und T7termi (s. Tab. 4) konnte der richtige Einbau des Inserts bestätigt werden. Das Insert befand sich in richtiger Orientierung zum T7-Promotor und im korrekten Leserahmen zu den Translationssequenzen des Vektors. Auch die erwarteten Start- und Stopp-Codons waren vorhanden. Abbildung 9 zeigt die physikalische Karte des Plasmids pKH9.

3.1.1.4 Klonierung des Gens *fqoF* der F₄₂₀H₂-Chinon-Oxidoreduktase aus *A. fulgidus* in den Überexpressionsvektor pASK-IBA5

Da mit dem FqoF Protein aus *A. fulgidus* Kristallisationsexperimente durchgeführt werden sollten und davon auszugehen ist, dass sich unterschiedliche Aufreinigungen auf das Kristallisationsverhalten auswirken, erschien es von Vorteil möglichst viele Aufreinigungsmethoden anzuwenden. Aus diesem Grund wurde das *fqoF* Gen in den Überexpressionsvektor pASK5 kloniert, um anschließend das heterolog produzierte Protein mittels Affinitätschromatographie reinigen zu können.

Die pASK-IBA-Vektoren der Firma IBA Göttingen zeichnen sich durch einen acht Aminosäuren langen Strep-Tag II aus, der eine Aufreinigung des heterolog produzierten Fusionsproteins mittels einer Affinitätschromatographie an Strep-Tactin ermöglicht. Weiterhin verfügen die pASK-Vektoren über einen induzierbaren Tet-Promotor. Der Tet-Repressor wird von einem Gen kodiert, welches auf dem pASK-Vektor liegt und konstitutiv durch den β -Lactamase-Promotor expremiert wird, so dass stets eine ausgewogene Balance zwischen der Anzahl an Repressorproteinen und Plasmid vorliegt. Die Expression des klonierten Gens wird so lange unterdrückt, bis eine Induktion mit Anhydrotetracyclin (AHT) erfolgt. Eine Tandem-RBS sorgt für eine effiziente Initiation der Translation. Außerdem verfügen die Vektoren über die intergene Region des Phagen fl für die Herstellung von ssDNA sowie über das β -Lactamase-Resistenz-Gen für die Ausbildung der Ampicillin-Resistenz. Für die Klonierung des Gens *fqoF* in den Vektor pASK-IBA5 (s. Tab. 3) wurde der Primer fqoFstrep fw und der revers orientierte Primer fqoFstrep rev (s. Tab. 4) verwendet.

3.1.1.5 Amplifizierung des Gens *fqoF* der F₄₂₀H₂-Chinon-Oxidoreduktase aus *A. fulgidus* mittels PCR zur Klonierung in pASK-IBA5

Es wurde vorgegangen wie in 3.1.1.1 beschrieben, nur dass *BsaI*-Schnittstellen an das 5'- und 3'-Ende über entsprechend konstruierte Primer an das PCR-Produkt angefügt wurden. Die Start- und Stopp-Codons des Gens wurden nicht mit amplifiziert, da diese durch den Vektor gestellt wurden. Abweichend zu 3.1.1.1 betrug die Annealing-Temperatur 50 °C. So entstand ein PCR-Produkt mit einer Größe von 1074 bp, das sich aus den 1038 bp des *fqoF* Gens (ohne Start und Stopp; Abb. 10) und den eingefügten Schnittstellen für das Restriktionsenzym *BsaI* (36 bp) zusammensetzte.

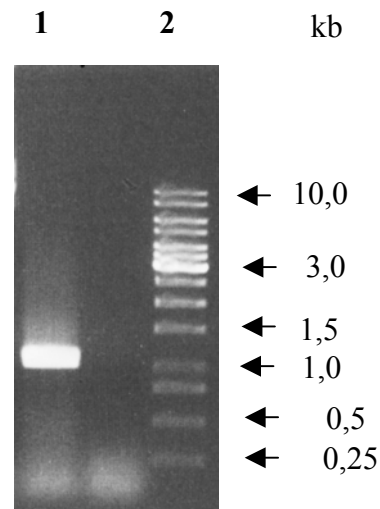


Abb. 10: Amplifizierung des *fqoF*-Gens aus *A. fulgidus* zur Klonierung in pASK-IBA5

Es wurde ein 1074 bp-großes PCR-Produkt durch die Primer Fstrep fw und Fstrep rev erzeugt und elektrophoretisch in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Spur 1: 1 kb-Ladder

Spur 2: 1074 bp-großes PCR-Produkt

3.1.1.6 Klonierung und Sequenzierung des Gens *fqoF* mit eingefügten *BsaI* Schnittstellen in pMPM-T3

Das 1074 bp große PCR-Fragment wurde wie in Kapitel 3.1.1.2 beschrieben in den Vektor pMPM-T3 kloniert. Es fanden sich mehrere Klone, deren Plasmide nach einer Linearisierung mit *XbaI* die erwartete Größe von 4751 bp aufwiesen. In Abbildung 11 ist ein Restriktionsverdau mit *BsaI*, des rekombinanten Plasmids aus Klon 2 auf einem 0,8 %igen Agarosegel dargestellt. Neben dem leeren 3,677 kb-große Vektor pMPM-T3 ist auch das 1,074 kb große Insert zu erkennen. Das rekombinante Plasmid wurde als pKH2 bezeichnet.

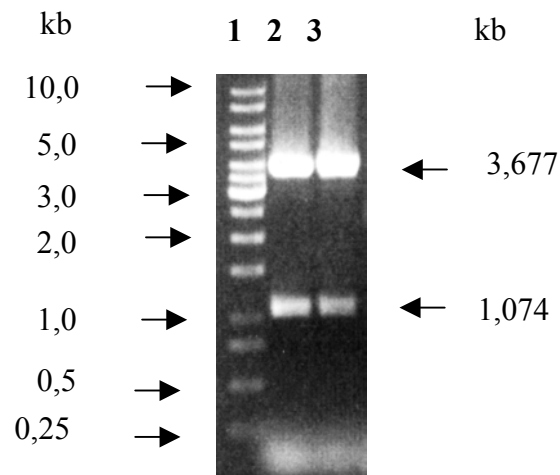


Abb. 11: Restriktionsverdau des rekombinanten Plasmids pKH2

Die DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt

Spur 1: 1 kb-Ladder

Spur 2: pKH2, *BsaI*-geschnitten

Spur 3: pKH2, *BsaI*-geschnitten

Nach einer Sequenzierung (s. 2.8) des rekombinanten Plasmids stellte sich heraus, dass alle erwarteten Schnittstellen vorhanden waren.

3.1.1.7 Umklonierung des Gens *fqoF* aus pMPM-T3 in pASK-IBA5

Um das Gen *fqoF* aus pKH2 in pASK-IBA5 zu klonieren, wurde wie in 3.1.1.3 beschrieben vorgegangen, jedoch wurden pKH2 und pASK-IBA5 in diesem Fall mit dem Restriktionsenzym *BsaI* verdaut. Es wurden 40 Kolonien mittels Kolonie-PCR überprüft (s. 2.5). Mit den Sequenzierprimern pASK (fw) und pASK (rev) konnten vier Klone identifiziert werden, welche das *fqoF* Gen in das Plasmid pASK-IBA5 inseriert hatten. Abbildung 12 zeigt ein 0,8 %iges Agarosegel, auf welchem neun PCR Produkte aufgetragen wurden. In Spur 4 ist das Amplifikat aus Klon 215 mit einer Größe von 1,364 kb zu erkennen. Dies setzte sich aus den 1,048 bp des Inserts und einem 320 bp großen Bereich des Vektors zusammen, der in der PCR Reaktion mit amplifiziert wurde.

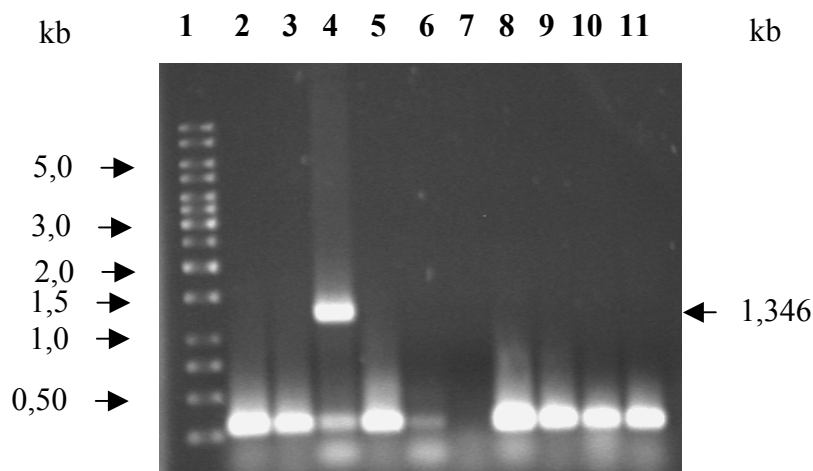


Abb. 12: Kolonie-PCR der pASK-IBA5-Klone

elektrophoretische Auftrennung in einem 0,8 %igen Agarosegel

Spur 1: 1 kb-Ladder

Spur 2-11: PCR-Produkte der Kolonie-PCR

Spur 4: gewünschtes Amplifikat 1,346 kb Klon 215

Spur 7: negativ Kontrolle

Der Klon 215 wurde in Flüssig-Medium angezogen, das Plasmid isoliert und mit dem Restriktionsenzym *Xba*I linearisiert (Abb.13).

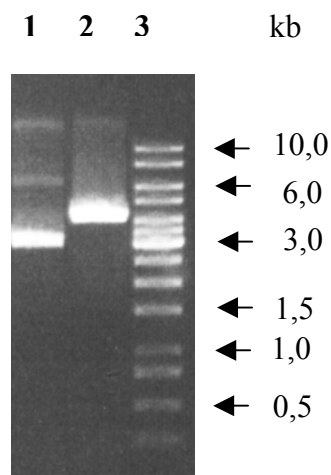


Abb. 13: Verdau des Plasmids pKH215 mit Hilfe des Restriktionsenzym *Xba*I

elektrophoretische Auftrennung in einem 0,8 %igen Agarosegel

Spur 1: pask-IBA5 *Xba*I geschnitten (3,2 kb)

Spur 2: pKH215 *Xba*I geschnitten (4,2 kb)

Spur 3: 1 kb DNA Ladder

Bei der Sequenzierung des Plasmids pKH215 mit den Sequenzierprimern pASK (fw) und pASK (rev) (s. Tab. 4), konnte der richtige Einbau der Inserts bestätigt werden. Abbildung 14 zeigt eine physikalische Karte des Plasmids pKH215.

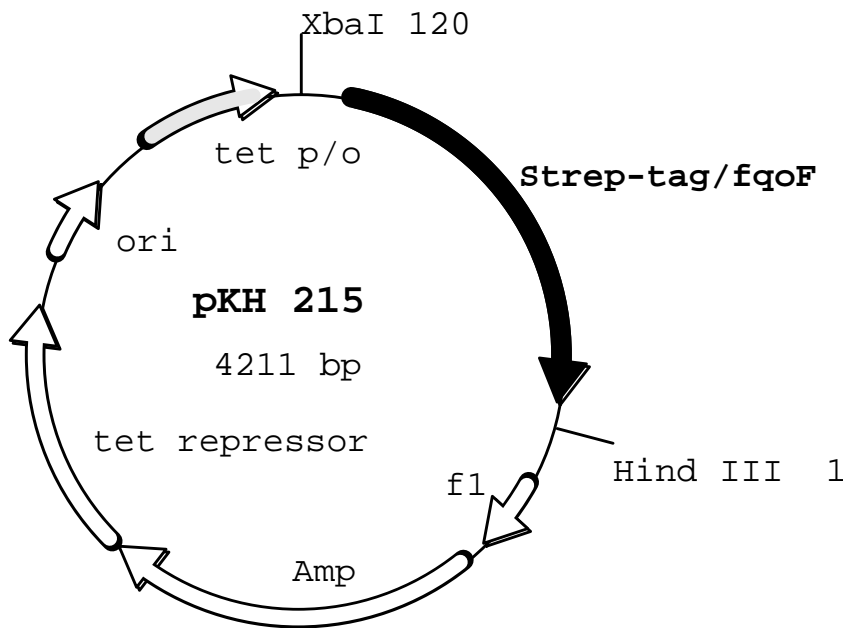


Abb. 14: Physikalische Karte des Plasmids pKH215

entstanden aus der Ligation des 1,074 kb-großen *BsaI*-Fragments aus pKH2 mit dem *BsaI*-geschnittenen pASK-IBA5

3.1.2 Klonierung und Sequenzierung des Gens *fpoF* aus *Methanosarcina acetivorans* in den Überexpressionsvektor pASK-IBA5

Zusätzlich zu der thermostabilen Untereinheit FqoF aus *A. fulgidus* sollte auch ein homologes Protein aus einem mesophilen Archaeon überproduziert und aufgereinigt werden. Zur Überexpression wurde das *fpoF*-Gen aus *Ms. acetivorans* ausgewählt. Weiterhin sollte ermittelt werden, ob in dem Protein FpoF aus *Ms. acetivorans* die gleichen prosthetischen Gruppen vorhanden waren wie in dem entsprechenden Protein FqoF aus *A. fulgidus*, und ob dieses Protein ebenfalls über eine $F_{420}H_2$ abhängige Dehydrogenase Aktivität verfügt.

Hierfür sprach, dass die Untereinheiten FpoF und FqoF in der Aminosäuresequenz jeweils zwei Bindemotive für tetranukleare Eisen-Schwefelzentren und ein Bindemotiv für ein FAD aufweisen (siehe 4.2.1.1 und 4.2.1.2). Außerdem erschien es sinnvoll für Kristallisationsexperimente ein zweites Inputmodul der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase zur Verfügung zu haben, das aus einem mesophilen Vertreter stammt und daher andere Kristallisationseigenschaften aufweisen sollte.

Zu diesem Zwecke wurde das *fpoF* Gen aus *Ms. acetivorans* in den Überexpressions-Vektor pASK-IBA5 kloniert. Dieses Gen wurde dem der nah verwandten Organismen *Ms. mazei* und *Ms. barkeri* vorgezogen, da diese mehrere Schnittstellen für das Restriktionsenzym *BsaI* besitzen und die Klonierung in den Überexpressionsvektor pASK-IBA5 sich aus diesem Grund schwieriger gestalten würde. Auch das *Ms. acetivorans* Gen besitzt am 5'-Ende eine *BsaI* Schnittstelle. Diese konnte jedoch mit Hilfe eines heterologen Primers (*fpoF ac2rev*) über den Austausch einer Base eliminiert werden.

3.1.2.1 Amplifizierung des Gens *fpoF* der $F_{420}H_2$ -Phenazin-Oxidoreduktase aus *Methanosarcina acetivorans* mittels PCR

Zur Klonierung des Gens *fpoF* in den Vektor pASK-IBA5 (s. Tab. 3) wurde der Primer *fpoF ac2fw* und der revers orientierte Primer *fpoF ac2rev* (s. Tab. 4) verwendet. Es wurde, wie in 3.1.1.5 beschrieben, über entsprechend konstruierte Primer *BsaI*-Schnittstellen an das 5'- und 3'-Ende des PCR-Produktes angefügt. Abweichend zu 3.1.1.5 betrug die Annealing-Temperatur 55 °C. So konnte ein PCR-Produkt mit einer Größe von 1071 bp amplifiziert werden (Abb. 15).

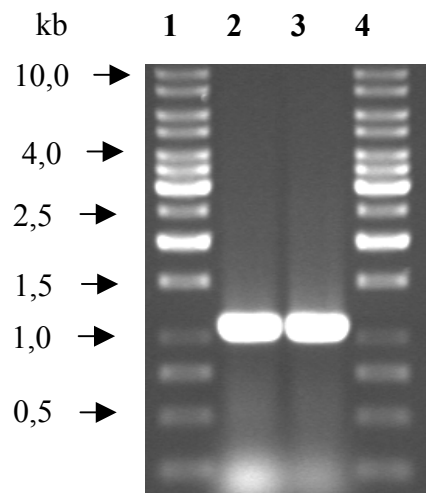


Abb. 15: Amplifizierung des *fpoF*-Gens zur Klonierung in pASK-IBA5

Es wurde ein 1071 bp-großes PCR-Produkt durch die Primer *fpoF* ac2fw und *fpoF* ac2rev erzeugt und elektrophoretisch in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Spur 1 und 4: 1 kb-Ladder

Spur 2 und 3: 1071 bp-großes PCR-Produkt

3.1.2.2 Klonierung und Sequenzierung des Gens *fpoF* in pZErO

Für den ersten Klonierungsschritt des amplifizierten 1,071 kb-Fragments wurde in diesem Fall der 3,3 kb große Vektor pZErO-2 gewählt. Dieser Vektor liegt in großer Kopienzahl in *E. coli* vor und kodiert für eine Kanamycin-Resistenz. Zudem verfügt der Vektor über ein sogenanntes „Suicide-Gen“ (*ccdB*). Das Genprodukt CcdB liegt als Fusionsprotein mit der *lacZ* α -Untereinheit vor. Die MCS befindet sich in dem Gen für die *lacZ* α -Untereinheit. In dem Fall, dass die *lacZ* α -Untereinheit nicht durch ein kloniertes Insert unterbrochen wird, wird das Fusionsprotein exprimiert, was den Zelltod nach sich zieht. Dies ist sehr hilfreich bei der Selektion der Zielzellen, da nur die Zellen wachsen, bei denen eine Klonierung erfolgreich war. Die Klonierung erfolgte über die *EcoRV*-Schnittstelle, die in der MCS des Vektors lokalisiert ist. Durch diese Technik konnte ein geeignetes Plasmid erzeugt werden, das als pKH17 bezeichnet wurde.

Da der Ursprungsvektor pZErO-2 ebenfalls über eine *BsaI*-Schnittstelle verfügt, entstanden bei einem *BsaI* Verdau von pKH17 (Abb. 16) drei Fragmente mit Größen von 2,8 kb (pZErO-2), 0,5 kb (Vektorfragment) und 1,071 bp (Insert).

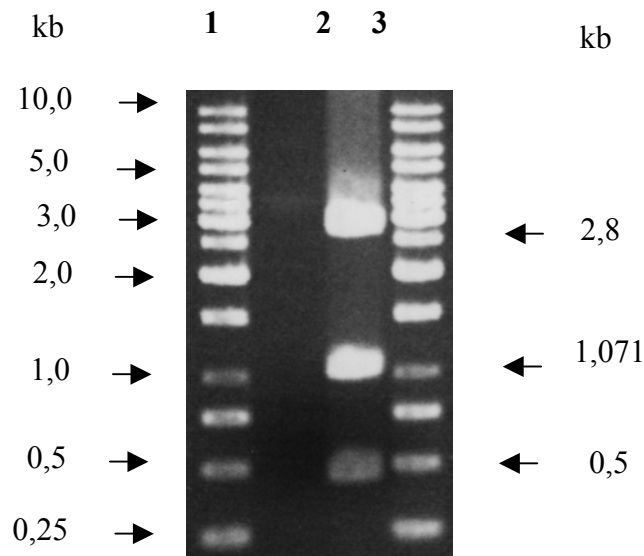


Abb. 16: Restriktionsverdau von pKH17 mit *BsaI*

Die Fragmente wurden elektrophoretisch in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt

Spur 1: 1 kb-Ladder

Spur 2: pKH17, *BsaI*-geschnitten

Es schloß sich die Sequenzierung (s. 2.8) des rekombinanten Plasmids an. Es stellte sich heraus, dass alle erwarteten Schnittstellen vorhanden waren und dass der erwünschte Basenaustausch zur Eliminierung der *BsaI* Schnittstelle des *fpoF* Gens stattgefunden hatte.

3.1.2.3 Umklonierung des *fpoF*-Gens von pZErO in pASK-IBA5

Zur Umklonierung in den Vektor pASK-IBA5 wurde sowohl der Ausgangs-, als auch der Zielvektor wurden mit dem Enzym *BsaI* verdaut (siehe 3.1.1.3). Durch einen Markerwechsel von Kanamycin auf Ampicillin wurden Klone selektiert, die das pASK-IBA5 Plasmid trugen.

Nach einer Plasmidisolierung konnte durch eine Linearisierung der Plasmide mit dem Restriktions-Enzym *XbaI* (Abb. 17) festgestellt werden, welche Plasmide das *fpoF* Gen inseriert hatten.

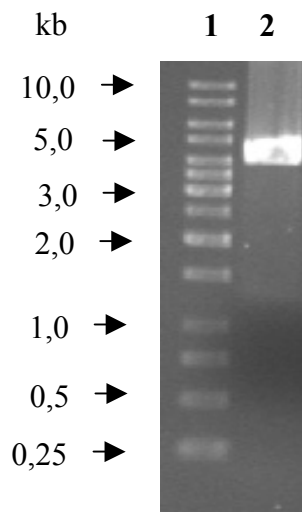


Abb. 17: Restriktionsverdau von pASKH9 mit *Xba*I

elektrophoretische Auftrennung in einem 0,8 %igen Agarosegel
 Spur 1: pASKH9 *Xba*I geschnitten (4,2 kb)
 Spur 2: 1 kb-Ladder

Bei der Sequenzierung des Inserts des rekombinanten Plasmids pASKH9 mit den Sequenzierprimern pASK-IBAfor und pASK-IBArev (siehe Tab. 4) konnte der korrekte Einbau der Inserts bestätigt werden. Abbildung 18 zeigt die physikalische Karte des Plasmids pASKH9.

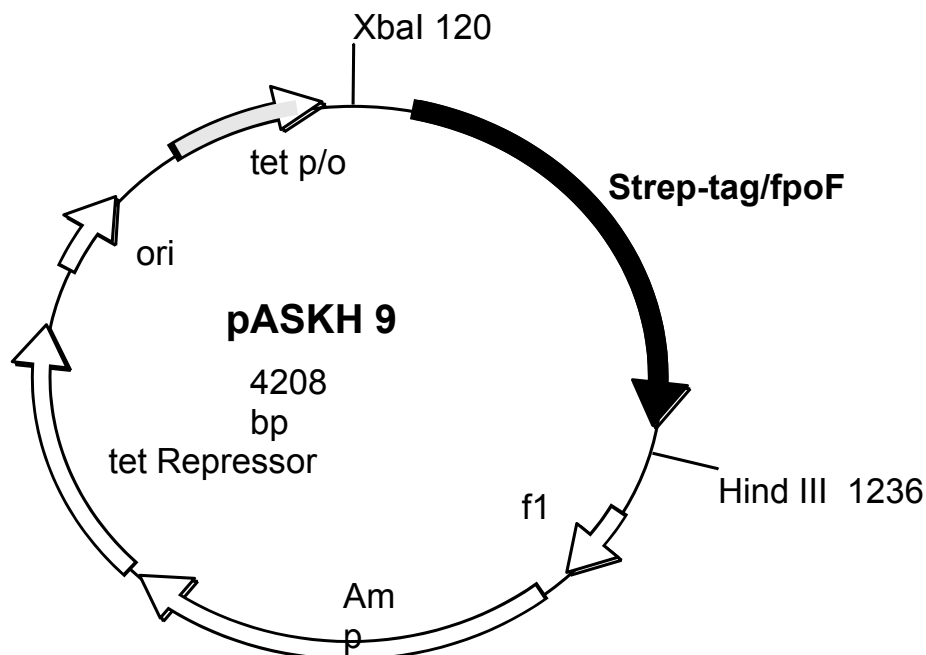


Abb. 18: Physikalische Karte des Plasmids pASKH9

entstanden aus der Ligation des 1,071 kb-großen *Bsa*I-Fragments aus pKH17 mit dem *Bsa*I-geschnittenen pASK-IBA5

3.1.3 Klonierung des Gens *fpoO* der F₄₂₀H₂-Phenazin-Oxidoreduktase aus *Methanosarcina mazei* in *E. coli*

Die FpoO Untereinheit ist das Genprodukt des *fpoO* Gens, welches am Ende des *fpo*-Operons lokalisiert ist. Derzeit wurden noch keine Proteine oder Gene gefunden, welche Homologien auf Nukleotid- oder Proteinebene mit dieser Untereinheit aufweisen. Sein Vorkommen scheint auf die Familie *Methanosarcinaceae* beschränkt zu sein (siehe 4.2). Die FpoO Untereinheit hat auf Aminosäureebene Bindmotive für zwei zweikernige Eisen-Schwefel-Zentren. Da über die Funktion des Proteins nichts bekannt war sollte das Protein in *E.coli* überproduziert werden, um es näher zu charakterisieren.

3.1.3.1 Amplifizierung des Gens *fpoO* mittels PCR

Es wurde wie in 3.1.1.5 beschrieben mit den Primern *fpoO* fw und *fpoO* rev ein 394 bp großes PCR-Produkt erzeugt, dass in Abb. 19 in einem Agarosegel in Spur 3 zu erkennen ist. Dieses PCR-Produkt beinhaltet eingefügte Schnittstellen für das Restriktionsenzym *BsaI*.

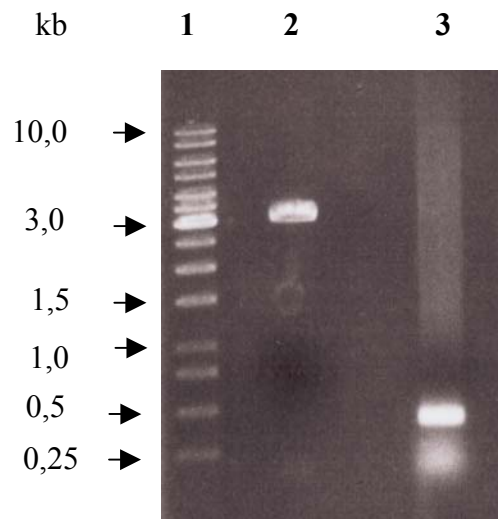


Abb. 19: Amplifizierung des Genbereichs *fpoO* zur Kolonierung in pASK-IBA3

Es wurde ein 394 bp großes PCR-Produkt durch die Primer *fpoO* fw und *fpoO* rev erzeugt und elektrophoretisch in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Spur 1: 1 kb-Ladder

Spur 2: pASK-IBA3 *BsaI* geschnitten

Spur 3: 394 bp-großes PCR-Produkt

3.1.3.2 Klonierung und Sequenzierung des Gens *fpoO* in pASK-IBA3

Das 394 bp-große PCR-Fragment wurde nach einem Restriktionsverdau mit *BsaI* und einer anschließenden Mikrodialyse direkt in den mit *BsaI* verdauten Überexpression Vektor pASK-IBA3 (Abb. 19, Spur 2) kloniert. Der Vektor pASK-IBA3 ermöglicht im Gegensatz zu dem Vektor pASK-IBA5 eine Aufreinigung über einen am C-Terminus des Proteins fusionierten Strep-Tag. Es ergab sich ein Plasmid, aus dem sich mittels eines Doppelverdaus mit *XbaI/HindIII* ein 455 bp großes Fragment herausschneiden ließ (Abb. 20). Durch den Doppelverdau mit *XbaI/HindIII* waren zwei Banden zu erkennen, die dem Vektor pASK-IBA3 und dem PCR-Fragment entsprachen. Das rekombinante Plasmid wurde als pASKH4 bezeichnet.

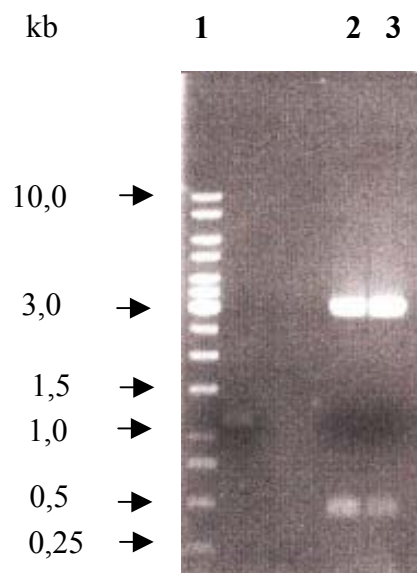


Abb. 20: Restriktionsverdaue des Plasmids pASKH4

elektrophoretische Auftrennung in einem 0,8 %igen Agarosegel

Spur 1: 1 kb-Ladder

Spur 2: pASKH4, *BsaI*-geschnitten

Spur 2: pASKH4, *BsaI*-geschnitten

In Abbildung 21 ist eine physikalische Karte des Plasmids pASKH4 dargestellt. Abgebildet sind das klonierte Gen *fpoO* mit entsprechender Orientierung in dem Vektor pASK-IBA3 und die flankierenden Schnittstellen, sowie die charakteristischen Gene und Eigenschaften des

Klonierungsvektors. Mittels einer Sequenzierung konnte der korrekte Einbau des Inserts bestätigt werden.

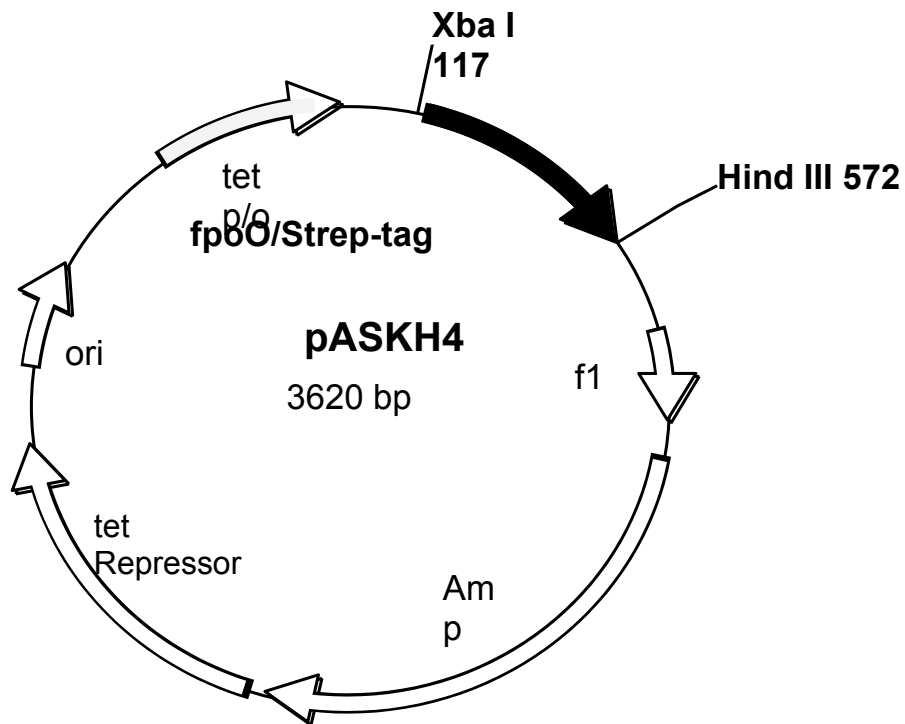


Abb. 21: Physikalische Karte des Plasmids pASKH4

entstanden aus der Ligation des 394 bp großen PCR-Fragments mit dem *Bsa*I-geschnittenen pASK-IBA3

3.2 Überproduktion und Aufreinigung von Untereinheiten der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase

Zur Überexpression der verschiedenen Untereinheiten der F₄₂₀H₂ Dehydrogenase wurden Methoden etabliert, die es ermöglichen sollten große Mengen Protein mit wenigen Aufreinigungsschritten zu erhalten. Die Proteine wurden jeweils aus 10 Liter Kulturen gewonnen. Bei der Überproduktion kam das pET-System der Firma Novagen und das Strep-Tag-System der Firma IBA Göttingen zum Einsatz. Die Aufreinigung erfolgte mit einer FPLC Anlage der Firma Amersham Pharmacia, Freiburg (Äkta Explorer 10, siehe Kapitel 2.12). Diese Anlage ermöglicht es, die Elution der Proteine mittels ihrer Absorption bei drei Wellenlängen gleichzeitig zu verfolgen. Das Säulenmaterial und die Leer-Säulen wurden von der Firma Amersham Pharmacia, bzw. das Strep-Tactin Material von der Firma IBA bezogen.

3.2.1 Überproduktion des FqoF Proteins in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)

Durch Vorarbeiten war bekannt, dass sich das FqoF Protein aus *A. fulgidus* heterolog in *E. coli* exprimieren lässt (BRÜGGEMANN et al., 2000). Zur Überexpression wurde das Plasmid pHB5 verwandt (Abb. 22). Das Plasmid trägt das *fqoF* Gen und zusätzlich ein 271 bp großes Fragment des *fqoI* Gens. Auf diesem *fqoI* Fragment befinden sich zwei zusätzliche ATG-Startcodons, welche sich „in frame“ zu dem Leserahmen des *fqoF* Gens befinden.

Umfangreiche Expressionsstudien zeigten, dass neben dem FqoF Protein, mit einer Masse von 39 kDa, zwei weitere, größere Proteine produziert wurden, die wahrscheinlich Fusionsproteine zwischen FqoI und FqoF darstellten. Diese ließen sich chromatographisch nicht von dem nativen FqoF Protein abtrennen (Abb. 23).

Die zwei zusätzlichen Proteine waren um 32 Aminosäuren bzw. um 20 Aminosäuren länger als das FqoF Protein und besaßen molekulare Massen von 43 bzw. 41 kDa. Um dieses Problem zu umgehen wurde das *fqoF* Gen separat mit Start und Stopp Codon in pET21c kloniert (s. 3.1.1). Die Überexpression des *fqoF* Gens erfolgte nun mit dem Plasmid pKH9.

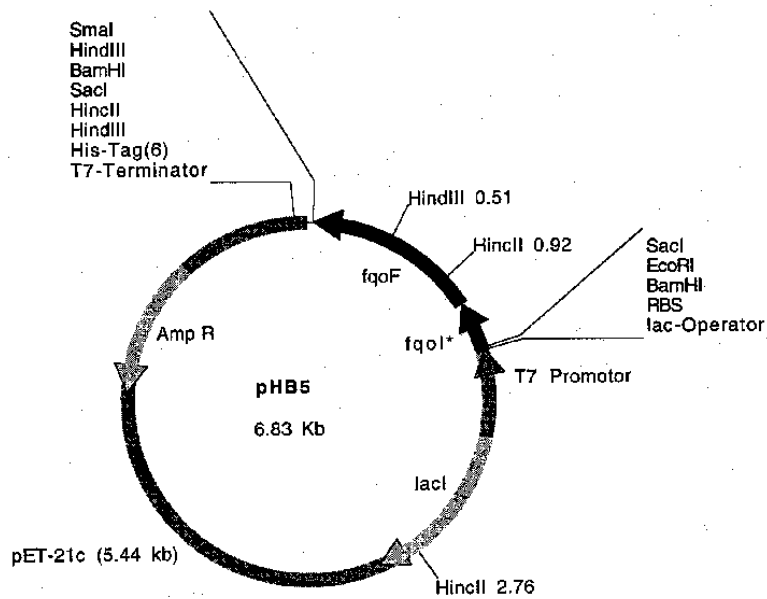


Abb. 22: Physikalische Karte des Plasmids pHB 5
(aus BRÜGGEMAN, 1999)

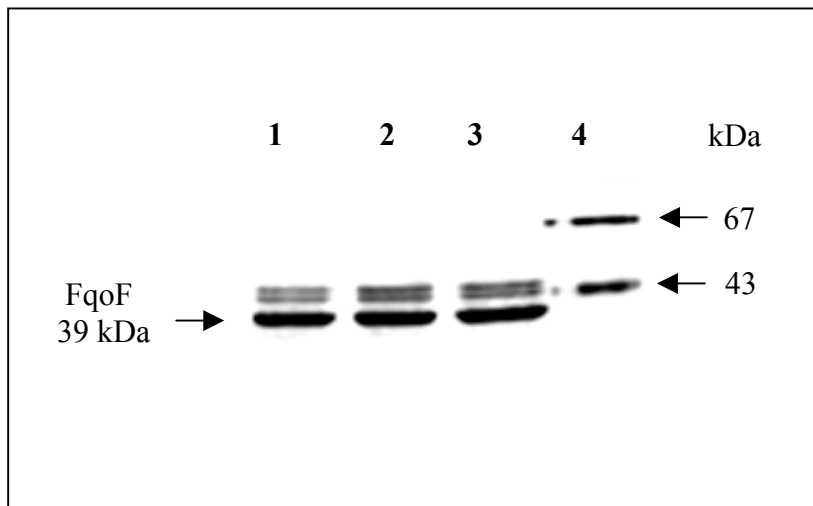


Abb. 23: 16 %ige SDS-PAGE-Analyse des mittels des Plasmids pHB5 expremierten und aufgereinigten FqcF Proteins

Spur 1-3 : Hydroxylapatit Pool

Spur 4 : LMW Marker

3.2.1.1 Heterologe Expression des Gens *fqoF* in *E. coli* BL21 (DE3) und Aufreinigung des FqoF Proteins mittels des pET-Systems

Der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) trägt das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lac* UV5-Promotors auf dem Chromosom. Durch Zugabe von IPTG lässt sich die T7-RNA-Polymerase sowie die Expression aller Gene, die unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehen, induzieren.

Das Plasmid pKH9 wurde in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert (s. 2.7.4). Mit Einzelkolonien wurden Vorkulturen beimpft, diese über Nacht bei 30 °C geschüttelt und schließlich zum Animpfen der 10 Liter Hauptkultur verwendet. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Kultur mit IPTG (s. 2.2.6) induziert und nach Induktion über Nacht am nächsten Morgen geerntet. Nach der Induktion in der frühen exponentiellen Phase wuchsen die Zellen trotz der Überexpression des heterologen Gens weiter und erreichten eine OD₆₀₀ von etwa 1,9. Das Zellpellet wurde direkt nach der Ernte in 200 ml Tris/NaCl Puffer aufgenommen, durch Ultraschall (s. 2.15.1) aufgeschlossen und weiterverarbeitet.

3.2.1.1.1 Anreicherung des FqoF Proteins durch Hitzefällung

Da das FqoF Protein aus *A. fulgidus* thermostabil ist, können viele Proteine des *E. coli* Wirts mit einer Hitzebehandlung bei 75 °C für 20 min gefällt werden (Abb. 25). Nach der Hitzebehandlung wurde der hitzegefällte Rohextrakt mit dem Detergenz Chaps versetzt (5 mM Endkonzentration) und zur Säulenchromatographie eingesetzt.

3.2.1.1.2 Chromatographie an Hydroxylapatit

Der hitzegefällte Rohextrakt (etwa 150 ml) wurde mit einer Flußrate von 2 ml/min auf eine mit Tris/NaCl Puffer äquilibrierte Hydroxylapatit-Säule mit einem Säulenvolumen von 25 ml aufgetragen. Eluiert wurde das Protein mit 1 M KP-Puffer (siehe 2.12.3). Einem zweistufigen Stufengradienten (7,5 und 15 % KP-Puffer) folgte ein linearer Gradient von 15 bis 60 % KP-Puffer. Das FqoF Protein eluiert bei einer KP-Puffer Konzentration von 330 mM von der Säule (Abb. 24).

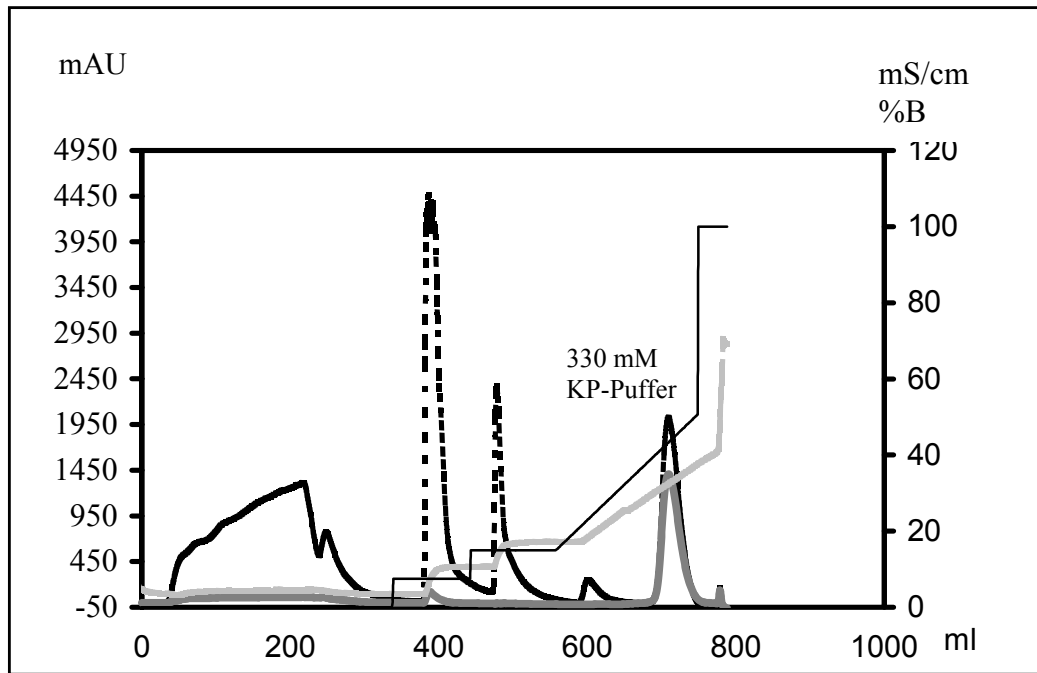


Abb. 24: Chromatographie an Hydroxylapatit

Aufgetragen wurden 150 ml des Hitze-gefällten Rohextrakts

UV1 280 nm mAU

UV2 420 nm mAU ———

Leitfähigkeit mS/cm ———

Konzentration KP-Puffer % B ———

Im Elutionsprofil ist auf der linken Ordinate die Absorption in mAU (Milli-Absorptions-Einheiten) und auf der rechten y-Achse die prozentuale Konzentration des Elutionspuffers B (KP-Puffer) bzw. dessen Leitfähigkeit in mS/cm aufgetragen. Auf der Abszisse ist das Elutionsvolumen in ml aufgetragen. Der Auftrag des Proteins auf die Säule und dessen Elution wurde anhand der Absorption bei 280 nm und 420 nm verfolgt. Sehr charakteristisch für das FqoF Protein ist seine starke Absorption bei 420 nm, was auf das gebundene FAD und die Eisen-Schwefelzentren zurückzuführen ist. Die Fraktionen, die bei etwa 330 mM KP-Puffer eluierten enthielten das FqoF Protein mit einer Aktivität von bis zu 9 U/mg. Diese Fraktionen wurden vereinigt und einer SDS-PAGE-Analyse unterzogen (Abb. 25).

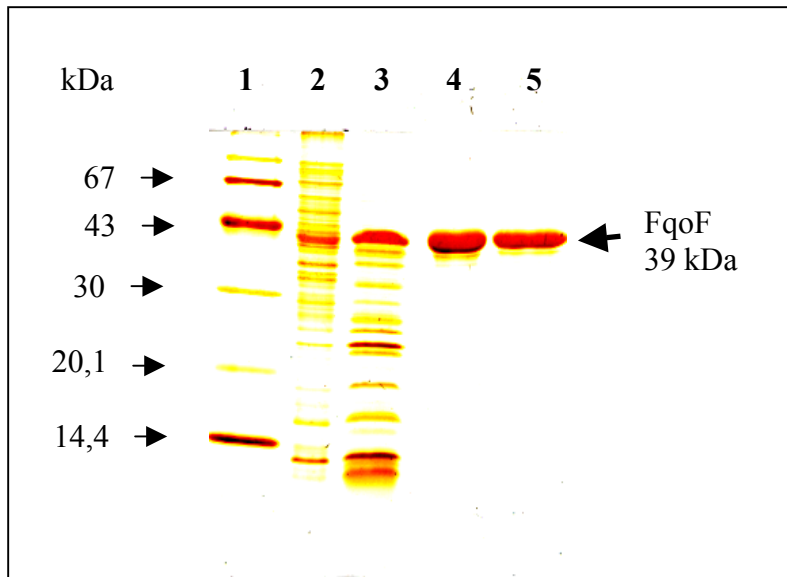


Abb. 25: Aufreinigung des FqoF Proteins mittels Hydroxylapathits
(16 %ige SDS-PAGE; 3 μ g Protein je Spur)

Spur 1 : LMW-Marker

Spur 2 : Rohextrakt aufgeschlossener BL21 Zellen mit pKH9

Spur 3 : hitzegefällter Rohextrakt

Spur 4 und 5 : gepoolte Fraktionen der Hydroxylapathit-Chromatographie

Aus der SDS-Page-Analyse wurde ersichtlich, dass das Protein bis zur Homogenität gereinigt worden war. Wie anhand der SDS-PAGE in Spur 4 und 5 (Abb. 25) zu erkennen ist, traten die beiden zusätzlichen Protein-Banden nicht mehr auf, die dem Fusionprotein aus aus FqoF und FqoI entsprachen (siehe Abb. 23). Somit bestätigte sich die Annahme, dass diese zusätzlichen Proteine aufgrund der beiden ATG-Startcodons, welche sich auf dem *fqoI* Fragment des Plasmids pHB5 befanden, gebildet wurden.

3.2.1.1.3 Gelfiltration mit Superdex 200®

Da mit dem FqoF Protein Kristallisationsexperimente zur Röntgenstrukturanalyse durchgeführt werden sollten, musste das Protein umpuffert werden, um störende Salze zu entfernen und um das Protein in den für die Kristallisation geeigneten Puffer aufzunehmen (20 mM Tris, pH 7,5, 50 mM NaCl, 2 mM DTT). Das Umpuffern geschah mit Hilfe einer Gelfiltrationssäule. Hierzu wurden der Hydroxylapathit-Pool auf ein Volumen von 2 ml mit Centricon Konzentratoren aufkonzentriert und auf eine mit Tris/NaCl Puffer äquilibrierte Superdex 200® XK16/60 Säule aufgetragen (Abb. 26). Die Flussrate betrug 1 ml pro Minute.

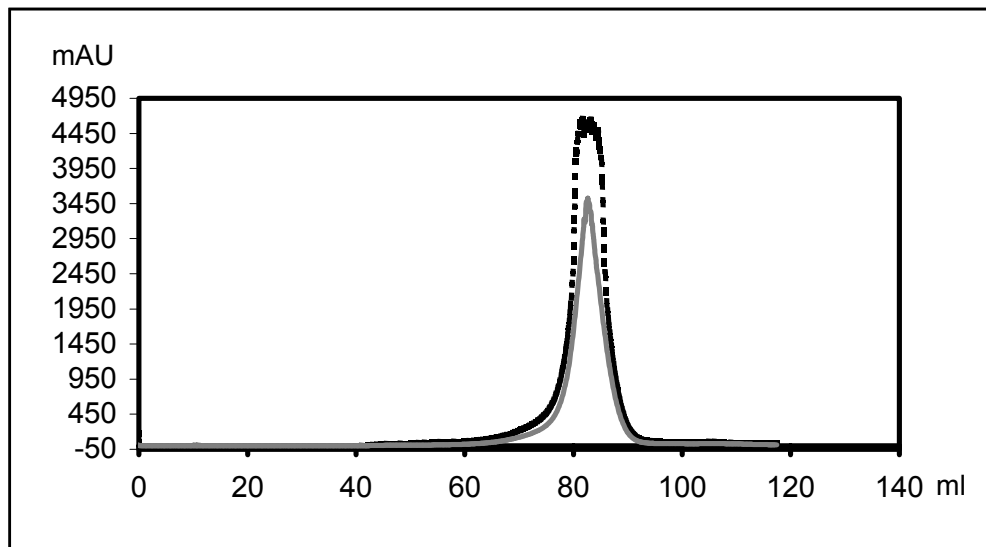


Abb. 26: Gelfiltration mit Superdex 200®

UV1 280 nm mAU ****
 UV2 420 nm mAU —

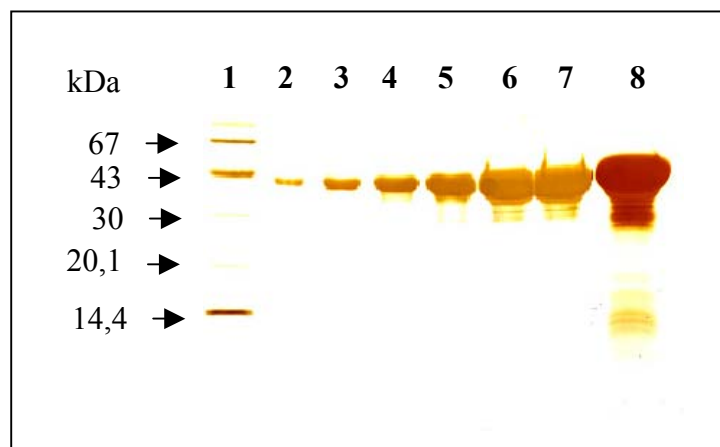


Abb. 27: 16 %ige SDS-PAGE Analyse des Gelfiltrations-Pools des FqoF Proteins

Spur 1: LMW-Marker
 Spur 2: 0,5 µg FqoF
 Spur 3: 1 µg FqoF
 Spur 4: 2,5 µg FqoF
 Spur 5: 5 µg FqoF
 Spur 6: 10 µg FqoF
 Spur 7: 15 µg FqoF
 Spur 8: 30 µg FqoF

Auch das Elutionsprofil der Gelfiltration (Abb. 26) legte die Vermutung nahe, dass das FqoF Protein nun homolog vorlag, da kein weiteres Protein von der Säule eluierte. Das FqoF Protein trat nach 82,5 ml von der Gelfiltrations-Säule aus. Die Fraktionen, welche das FqoF Protein enthielten, wurden gepoolt und wiederum mit Centricon-Konzentratoren auf eine Proteinkonzentration von 15 mg/ml eingestellt. Dieses Konzentrat wurde nun wiederum einer SDS-PAGE-Analyse unterzogen (Abb. 27).

Für die Kristallisationsexperimente, war es erforderlich homogenes Protein mit einer Konzentration von mindestens 10 mg/ml vorliegen zu haben.

Wurde das SDS-Gel stark überladen, so traten zusätzliche Banden bei ca. 30 kDa und bei ca. 14 kDa auf, wie in Abbildung 27 (Spur 8) zu sehen ist. Es stellte sich die Frage, ob es sich bei diesen zusätzlichen Banden um Kontaminationsproteine oder um Abbauprodukte handelte. Um diese Frage zu klären, wurde versucht diese Proteine durch weitere chromatographische Methoden abzutrennen. Außerdem wurde mit Protease-Inhibitoren gearbeitet, um einen proteolytischen Abbau des FqoF Proteins ausschließen zu können. Als weitere chromatographische Methoden kam eine Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie mit Phenylsepharose und eine Kationen-Austausch-Chromatographie zum Einsatz, jedoch brachten diese keinen weiteren Aufreinigungseffekt. Es stellte sich heraus, dass es sich bei diesen zusätzlichen Banden um einen Artefakt handelte (siehe 3.2.1.1.4).

3.2.1.1.4 SDS-PAGE-Analyse des FqoF Proteins unter verschiedenen Denaturierungsbedingungen

Zur Probenvorbereitung der Proteine, welche einer SDS-PAGE Analyse unterzogen werden sollten, wurden diese 1:1 mit Probenauftragspuffer versetzt und bei 100 °C für 10 Minuten denaturiert. Der Probenauftragspuffer 1 enthält unter anderem 2 % w/v SDS und 5 % Mercaptoethanol zur Denaturierung der Proteine (s. 2.9.4). In Abbildung 28 wurde eine SDS-PAGE mit dem FqoF Protein unter verschiedenen Denaturierungsbedingungen durchgeführt. Das FqoF Protein wurde mit Proben-auftragspuffer 1 und mit Probenauftragspuffer 2, welcher zwei mal mehr SDS und Mercaptoethanol enthielt, versetzt und bei Raumtemperatur und bei 100 °C für 10 Minuten denaturiert.

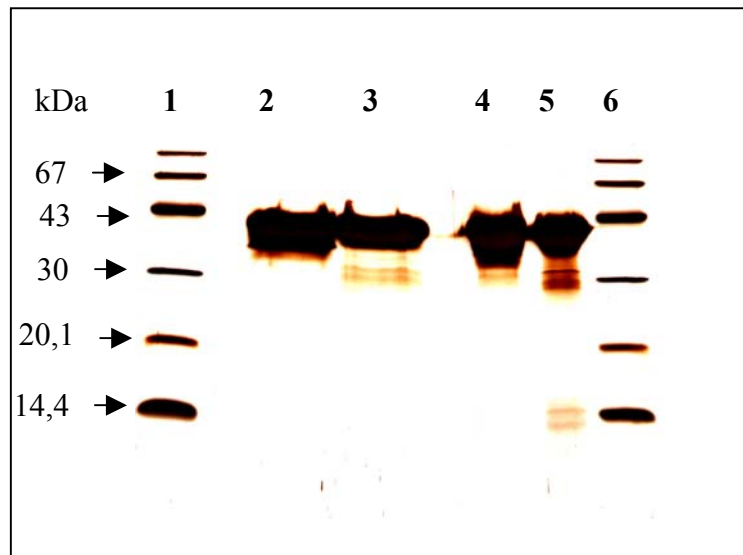


Abb. 28: 16 %ige SDS-PAGE Analyse des FqoF Proteins unter verschiedenen Denaturierungsbedingungen (je Spur 15 µg Protein)

Spur 1 und 6 : LMW-Marker

Spur 2: 10 min Denaturierung bei RT mit Probenaufragspuffer 2

Spur 3: 10 min Denaturierung bei 100°C mit Probenaufragspuffer 2

Spur 4: 10 min Denaturierung bei RT mit Probenaufragspuffer 1

Spur 5: 10 min Denaturierung bei 100°C mit Probenaufragspuffer 1

Wurde das FqoF Protein mit dem Probenaufragspuffer 2 bei Raumtemperatur denaturiert (Abb. 28, Spur 2) traten keine zusätzlichen Banden auf. Bei der Verwendung des Probenaufragspuffers 1 und einer Denaturierung bei 100 °C konnten hingegen wieder die zusätzlichen Banden beobachtet werden (Abb. 28, Spur 5). Bei diesen zusätzlichen Banden handelte es sich demnach um einen Artefakt, der nur dann auftrat, wenn große Proteinmengen auf das Gel aufgetragen wurden, die vorher mit Probenaufragspuffer 1 bei 100°C denaturiert wurden. Denaturierte man das Protein hingegen bei RT traten auch mit Probenaufragspuffer 1 deutlich weniger Abbauprodukte auf (Abb. 28, Spur 4), wohingegen bei Verwendung des Probenaufragspuffer 2 diese nicht mehr beobachtet werden konnten. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass das Fqo F Protein tatsächlich bis zur Homogenität aufgereinigt worden war und es so in Kristallisationsexperimenten eingesetzt werden konnte.

3.2.1.1.5 Ermittlung der molekularen Masse des nativen FqoF Proteins

Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, eluierte das FqoF Protein bei 82,5 ml (V_e) von der Superdex 200® XK16/60 Säule. Verwendet man nun Eichproteine (Gel-Filtrations Standard der Firma Bio-Rad) bekannter molekularer Masse, kann man anhand deren Elutionsverhalten eine Eichgerade erstellen (Abb. 29) und die molekulare Masse des FqoF Proteins bestimmen (s. 2.12.4).

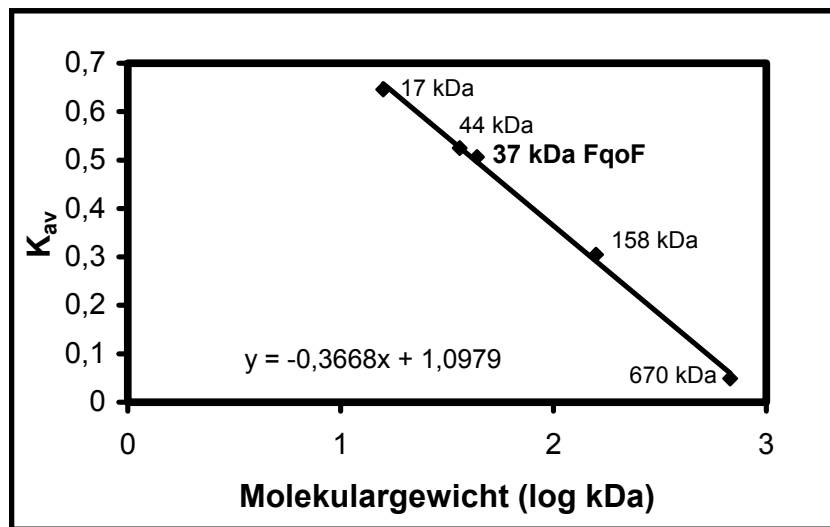


Abb. 29: Eichung der Superdex 200® XK16/60 Säule

Die Standard-Proteine hatten folgendes Molekulargewicht:

Thyroglobulin 670 kDa; Bovine Gamma Globulin, 158 kDa; Hühner Ovalbumin, 44 kDa und Myoglobin, 17 kDa.

Es wurde der Logarithmus der molekularen Masse der Eichproteine gegen deren Verteilungskoeffizienten [$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$] aufgetragen. Das Ausschlussvolumen (V_0) betrug 40 ml und das Gesamtvolumen (V_t) der Säule 121 ml. Aus der Regressionsgeraden ließ sich der Verteilungskoeffizient des FqoF Proteins bestimmen. Er betrug 0,525 was einer molekularen Masse von 37 kDa entspricht. Dieser Wert ist etwas geringer als die im denaturierenden Gel ermittelte Masse von 39 kDa.

Eine weitere Möglichkeit die molekulare Masse des nativen FqoF Proteins zu bestimmen, ist die Ermittlung des RF-Wertes. Hierzu wird mit Eichproteinen (HMW- Standard siehe 2.9.5) bekannter molekularer Masse und dem FqoF Protein eine native PAGE durchgeführt (Abb. 30). Aus einer halblogarithmischen Auftragung der Laufstrecke der Proteine in cm, gegen deren molekulare Masse in kDa, kann man eine Eichgerade erstellen, und daraus die molekulare Masse des FqoF Proteins bestimmen (Abb. 31).

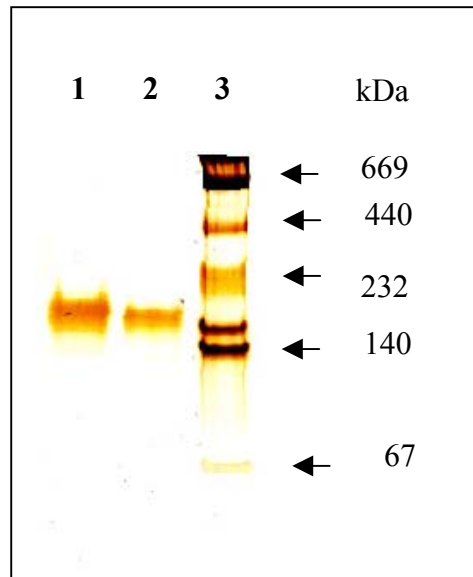


Abb. 30: Native PAGE des FqoF Proteins (Gradient 4-20 %)

Spur 1: 3 μg gereinigtes FqoF
 Spur 2: 1,5 μg gereinigtes FqoF
 Spur 3: HMW-Marker

Aus der Eichgeraden ergab sich eine molekulare Masse des nativen FqoF Proteins von 190 kDa. Offensichtlich zeigte das FqoF im nativen Polyacrylamid-Gel das Laufverhalten eines Pentamers. Jedoch war deutlich zu erkennen, dass keine weiteren Banden auftraten und das Protein somit als homogen bezeichnet werden konnte.

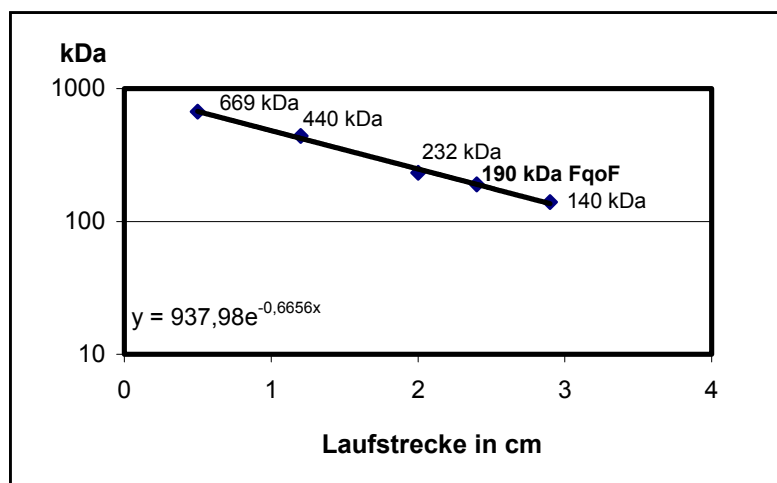


Abb. 31: Eichgerade zur Bestimmung der molekularen Masse des nativen FqoF Proteins; Eichproteine HMW- Standard siehe 2.9.5

3.2.1.1.6 Aufreinigungsprotokoll des FqoF Proteins

In Tabelle 5 ist ein Protokoll der Aufreinigung von FqoF dargestellt. 200 ml Rohextrakt wurden aus den Zellen einer 10 Liter Kultur gewonnen. Auffällig bei der Aufreinigung des FqoF Proteins war, dass scheinbar durch die Hitzebehandlung eine Aktivierung des Proteins stattfand, da vor der Hitzebehandlung die Gesamtaktivität des Rohextraktes mit 450 U deutlich unter der des hitzebehandelten Rohextraktes mit 612 U lag. Das Volumen des hitzegefällten Rohextraktes betrug 175 ml und die spezifische Aktivität lag bei 5 U pro ml. Die Aktivität wurde wie unter 2.14.2 beschrieben mit $F_{420}H_2$ als Elektronendonator und MV-MTZ als künstlichen Elektronen Akzeptor bei Raumtemperatur ermittelt. Die spezifische Aktivität betrug im Gelfiltrations-Pool 7,4 U/mg. Es konnte eine 32fache Anreicherung erzielt und insgesamt aus 10 Litern Kultur 37 mg gereinigtes Protein gewonnen werden.

Tabelle 5: Aufreinigungsprotokoll des FqoF Proteins aus einer 10 Liter Kultur

Aufreinigungs-Schritt	Rohextrakt vor Hitzebehandlung	Rohextrakt nach Hitzebehandlung	Hydroxylapatit-Pool	Gelfiltrations-Pool
Volumen in ml	200	175	60	2
Protein absolut mg	1952,5	122,5	63	37
Protein mg/ml	11	0,7	1,05	18,5
Aktivität U/ml	2,5	3,5	5,8	136
Spezifische Aktivität U/mg	0,23	5	7,3	7,4
Gesamtaktivität in U	450	612,5	348	272
Anreicherungs Faktor	1	22	32	32
Ausbeute %	100	136	77	60

Die Ausbeute lag ausgehend vom Rohextrakt bei 60 %. Setzt man jedoch die Gesamtaktivität des hitzebehandelten Rohextraktes 100 %, so betrug die Ausbeute nur 44 %. Zu diesen Verlusten kam es hauptsächlich beim mehrmaligen Aufkonzentrieren, welches vor und nach der Gelfiltration notwendig war. Um diese Verluste in Grenzen zu halten, wurde im Folgenden dazu übergegangen eine Superdex 200® XK26/90 Säule zu verwenden, welche mit bis zu 4 ml beschickt werden konnte.

3.2.1.2 Überexpression und Aufreinigung des FqoF Proteins mit dem IBA Strep-Tag-System

Um große Mengen des FqoF Proteins zu gewinnen, wurde eine weitere Methode der Reinigung gewählt. Die pASK Vektoren der Firma IBA Göttingen ermöglichen eine Aufreinigung über eine Strep-Tactin-Affinitätschromatographie (s. 2.12.2). Hierzu wurde das FqoF Protein mit einem N-terminalen Strep-Tag versehen, indem das *fqoF* Gen aus *A. fumigatus* in den Überexpressions-Vektor pASK-IBA5 kloniert wurde (siehe 3.1.1.4). Da die Art der Anreicherung sehr entscheidend für das Kristallisationsverhalten des Proteins sein kann, wurde diese sehr schonende Aufreinigungsmethode verwendet. Außerdem war die augenscheinliche Aktivitäts-steigerung des FqoF Proteins nach einer Hitzebehandlung ein Indiz für eine eventuelle Konformationsänderung der Untereinheit, die nicht unbedingt förderlich für die Kristallisationseigenschaften sein musste. Somit erschien es sinnvoll das FqoF Protein, parallel zu der unter 3.2.1.2 beschriebenen Methode, auch ohne Hitzebehandlung des Rohextraktes aufzureinigen, wobei dies mit Hilfe des Strep-Tags geschah.

Hierzu wurde das Plasmid pKH215 (s. Abb. 14) durch Transformation in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) übertragen (s. 2.7.4). Es wurden Einzelkolonien gepickt, mit denen Vorkulturen beimpft wurden. Diese wurden über Nacht bei 30 °C geschüttelt und dienten zum Animpfen der 10 Liter Hauptkultur. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Kultur mit AHT (s. 2.2.6) induziert und nach Induktion über Nacht am nächsten Morgen bei einer OD₆₀₀ von etwa 1,9 geerntet. Das Zellpellet wurde direkt nach der Ernte in 200 ml Puffer W (100 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl), aufgenommen, durch Ultraschall (s. 2.15.1) aufgeschlossen und bei 10000 Upm für 20 Minuten abzentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet und 10fach aufkonzentriert.

3.2.1.2.1 Affinitäts-Chromatographie des FqoF Proteins an Strep-Tactin

Von dem aufkonzentrierten Rohextrakt wurden 6 ml auf eine mit Puffer W (100 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl), äquilibrierte Strep-Tactin-Säule aufgetragen. Das Säulenvolumen betrug 15 ml und der Auftrag des Rohextraktes erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml pro Minute. Das Protein wurde mit 100 % Puffer E (Puffer W + 2,5 mM Desthiobiotin) von der Säule eluiert. In Abbildung 32 sieht man ein Elutionsprofil der Affinitätschromatographie an Strep-Tactin.

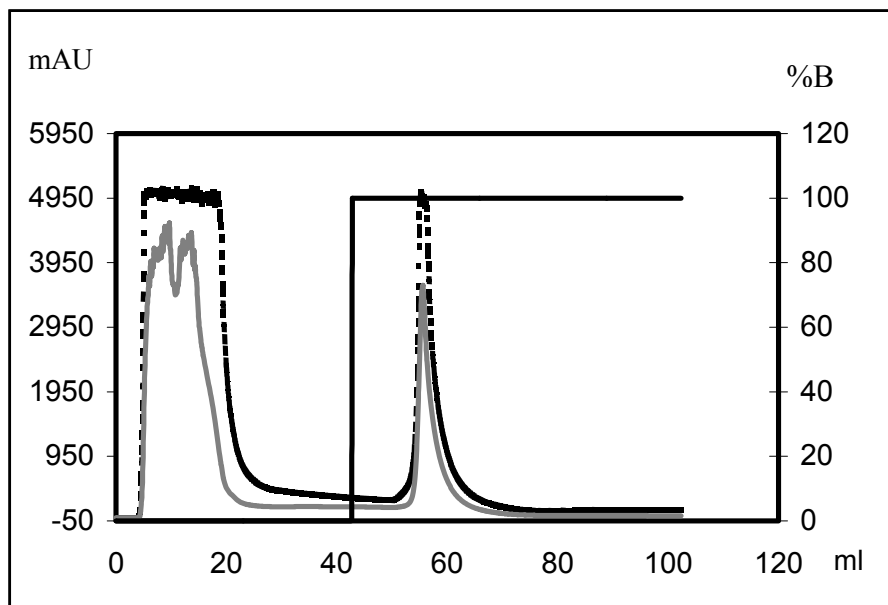


Abb. 32: Affinitäts-Chromatographie an Strep-Tactin

UV1 280 nm mAU
 UV2 420 nm mAU ———
 Konzentration Puffer E %B ———

Das FqoF Protein eluierte nachdem etwa ein Säulenvolumen (15 ml) Elutionspuffer über die Säule gelaufen war. Auch hier fiel die starke Absorption bei 420 nm auf. Aus 6 ml Rohextrakt konnten 15 mg FqoF gewonnen werden. Die das FqoF Protein enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt und einer SDS-PAGE Analyse unterzogen (Abb. 33). Die Aktivität lag mit 5 U/mg unter der des FqoF Proteins, welches mit Hilfe der Hitzebehandlung ohne Strep-Tag aufgereinigt worden war.

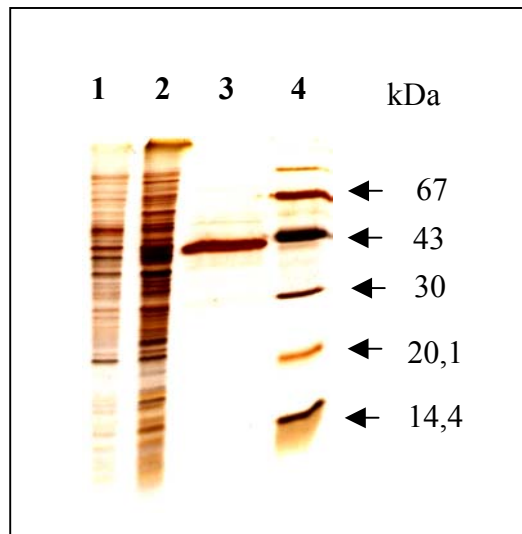


Abb. 33: 16 %ige SDS-PAGE Aufreinigung des FqoF Proteins via Strep-Tag

Spur 1: Rohextrakt mit leerem pASK-IBA5

Spur 2: Rohextrakt mit pKH215

Spur 3: Strep-Tactin Pool des aufgereinigten FqoF

Spur 4: LMW-Marker

Die SDS-PAGE in Abbildung 33 zeigt, dass das von der Strep-Tactin-Säule eluierte Protein noch leichte Verunreinigungen oberhalb von 43 kDa aufwies. Um diese abzutrennen und auch für den notwendigen Pufferwechsel zu sorgen, wurde das FqoF Protein wiederum einer Gelfiltration unterzogen.

3.2.1.2.2 Gelfiltration mit Superdex 200® XK26/90

Die Gelfiltration erfolgte erneut mit Superdex 200®, jedoch diesmal mit einem größeren Säulenvolumen (318 ml) in einer XK26/90 (Amersham/Pharmacia) Säule. Das mit dem Strep-Tag versehene FqoF Protein eluierte nach 205 ml von der Superdex 200® XK26/90 Säule (Abb. 34). Im Gegensatz zu dem FqoF Protein ohne Tag war bei dieser Gelfiltration bei 183 ml jedoch noch ein weiterer Peak zu erkennen. Hierbei handelte es sich um ein Dimer des FqoF Proteins, was durch eine SDS-PAGE-Analyse bewiesen werden konnte.

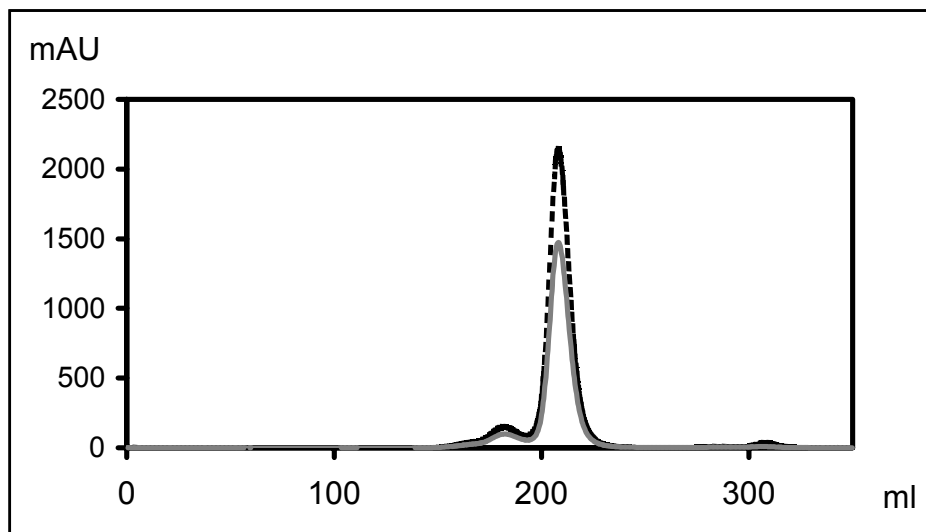


Abb. 34: Gelfiltration des FqoF Proteins (mit Strep-Tag) an Superdex 200® XK26/90

UV1 280nm mAU
UV2 420nm mAU ———

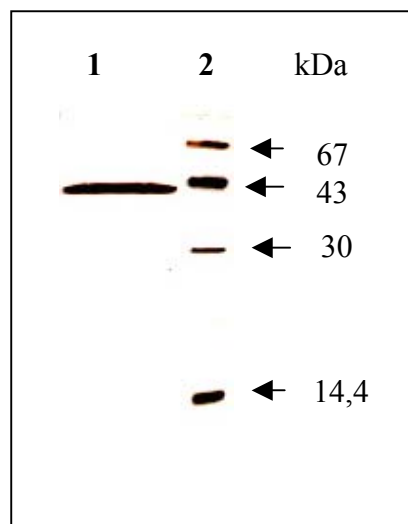


Abb. 35: 16 %ige SDS-PAGE des FqoF mit Strep-Tag nach der Gelfiltration

Spur 1 : aufgereinigtes FqoF Protein mit Strep-Tag (40 kDa)
Spur 2: LMW-Marker

Wiederum wurde der Pool der Gelfiltration einer SDS-Page Analyse unterzogen (Abb. 35). Nach Bestimmung des R_f -Wertes stellte sich heraus, dass das mit dem Strep-Tag versehene denaturierte FqoF Protein mit 40 kDa eine um 1 kDa größere molekulare Masse aufwies als das FqoF Protein ohne Tag. Das nun bis zur Homogenität aufgereinigte FqoF Protein wurde aufkonzentriert und auf einen, für die Kristallisationsexperimente notwendigen Proteingehalt von 15 mg/ml eingestellt.

3.2.1.2.3 Bestimmung der molekularen Masse des nativen FqoF Proteins mit Strep-Tag

Die Superdex 200® XK26/90 wurde mit Eichproteinen bekannter molekularer Masse geeicht und so eine Eichgerade erstellt (Abb. 36). Das Gesamtsäulenvolumen (V_i) betrug 318 ml und das Ausschlussvolumen (V_0) 107,5 ml.

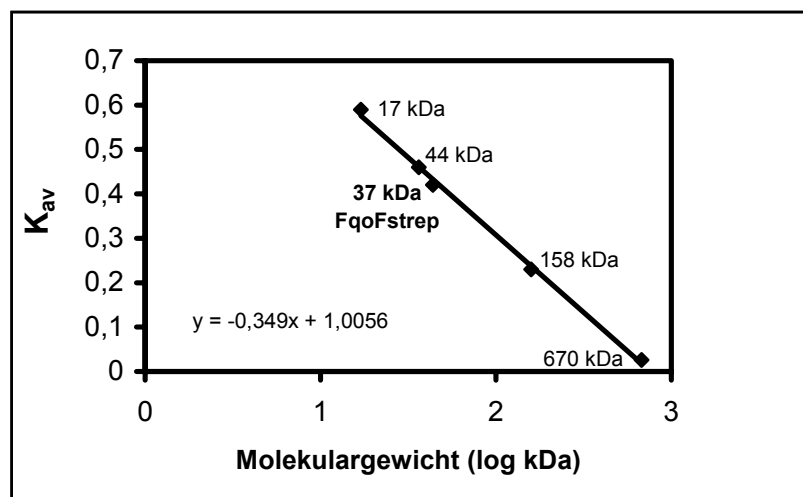


Abb. 36: Eichung der Superdex 200® XK26/90 Säule

Die Standard Proteine hatten folgendes Molekulargewicht:
Thyroglobulin 670 kDa; Bovine Gamma Globulin, 158 kDa; Hühner Ovalbumin, 44 kDa und Myoglobin, 17 kDa

Das FqoF Protein hatte unter denaturierenden Bedingungen im SDS-Gel eine molekulare Masse von 40 kDa, ist also etwa 1 kDa größer als das Protein ohne Tag. Unter nativen Bedingungen eluierte es von der Gelfiltrations-Säule bei 205 ml, was einem Verteilungskoeffizienten von 0,46 und einer molekularen Masse von 37 kDa entspricht.

3.2.1.2.4 Aufreinigungsprotokoll des FqoF Proteins mit Strep-Tag

Tabelle 6 zeigt ein Aufreinigungsprotokoll des FqoF Proteins, das mit Hilfe des Strep-Tag aufgereinigt wurde. Die aus einer 10 Liter Kultur gewonnenen Zellen wurden in 200 ml Puffer aufgenommen und der nach Zellaufschluß erhaltene Rohextrakt auf ca. 25 ml eingengt. Mit diesen 25 ml wurden dann vier Säulenläufe durchgeführt. Aus 10 Litern Zellkultur konnten so 33 mg des FqoF Proteins, mit einer $F_{420}H_2$ -Oxidase-Aktivität (siehe 2.14.2) von 6 U/mg bei Raumtemperatur, nach der Gelfiltration gewonnen werden. Dies entspricht einer Gesamtaktivität von fast 200 U. Die Ausbeute betrug 43 %. Die Verluste traten hauptsächlich beim Aufkonzentrieren des Proteins auf. Da die Bindekapazität des Säulenmaterials beschränkt war, mussten mehrere Säulenläufe durchgeführt werden, was ebenfalls zu Aktivitätsverlusten führte. Die Steigerung der spezifischen Aktivität, die sich bei der Aufreinigung des FqoF Proteins ohne Tag nach der Hitzebehandlung beobachten ließ, konnte nach einer Hitzebehandlung des Proteins mit Strep-Tag nicht beobachtet werden.

Tabelle 6: Aufreinigungsprotokoll FqoF mit Strep-Tag

Aufreinigungs-Schritt	Rohextrakt	Strep-Tactin Pool	Gelfiltrations Pool
Volumen in ml	25	4	2
Protein absolut mg	2000	60	33
Protein mg/ml	80	15	16,5
Spezifische Aktivität U/mg	0,23	5	6
Gesamtaktivität in U	460	300	198
Anreicherungs Faktor	1,0	22	27
Ausbeute %	100	65	43

3.2.2 Überexpression und Aufreinigung des FpoF Proteins aus *Ms. acetivorans* mittels des Strep-Tag-Systems

Auch das mesophile, methanogene Archaeon *Ms. acetivorans* besitzt eine F₄₂₀H₂-Dehydrogenase, die der aus *Ms. mazei* sowohl in der Organisation des Operons (siehe Abb. 65) als auch auf Nukleotid- und Proteinebene sehr homolog ist. Die aus der Aminosäuresequenz abgeleitete molekulare Masse des FpoF Proteins beträgt 39 kDa. Die Untereinheit FpoF aus *Ms. acetivorans* weist eine 85 %ige Identität zu der aus *Ms. mazei* auf. Demgegenüber sind nur 32 % der Aminosäuren identisch zur FqoF Untereinheit aus *A. fulgidus*. Zwar besitzen beide Inputmodelle der F₄₂₀H₂-Dehydrogenasen die gleiche Funktion, doch ist FqoF Bestandteil eines thermoresistenten Proteins, was die gravierenden Unterschiede in den Aminosäure-sequenzen erklären könnte. Um neben dem thermostabilen Protein FqoF auch noch ein mesophiles Inputmodul für Kristallisationsexperimente zur Verfügung zu haben, wurde das *fpoF* Gen aus *Ms. acetivorans* in den Überexpressionsvektor pASK-IBA5 kloniert (siehe 2.1) und in *E. coli* BL21(DE3) heterolog expremiert.

3.2.2.1 Heterologe Überexpression des FpoF Proteins in *E.coli* BL21(DE3)

Das Plasmid pASKH9 (siehe Abb. 18) wurde mittels Elektroporation in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert (s. 2.7.4). Zur Kontrolle wurde mit dem leeren Vektor pASK-IBA5 genauso verfahren. Es wurden Einzelkolonien gepickt, mit denen Vorkulturen beimpft wurden. Diese wurden über Nacht bei 30 °C geschüttelt und dienten zum Animpfen der Hauptkultur. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Kultur mit AHT (s. 2.2.6) induziert und nach Induktion über Nacht am nächsten Morgen geerntet. Nach der Induktion in der frühen exponentiellen Phase wuchsen die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 1,7. Das Zellpellet wurde direkt nach der Ernte in Puffer W (100 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl), aufgenommen, durch Ultraschall (s. 2.15.1) aufgeschlossen und bei 10000 Upm für 20 Minuten zentrifugiert. Der so erhaltene Rohextrakt wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 37).

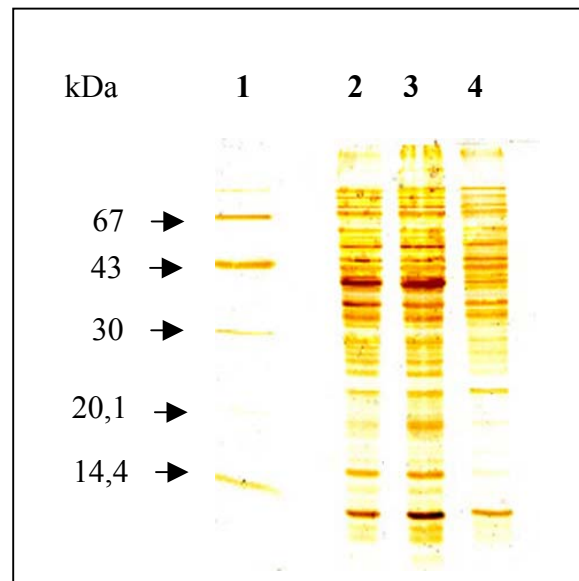


Abb. 37: 16 %ige SDS-PAGE-Analyse des Rohextraktes aus *E.coli* BL21 mit pASKH9

- Spur 1: LMW-Marker
- Spur 2: aufgeschlossene BL21 Zellen mit Plasmid pASKH9
- Spur 3: Rohextrakt (10000 Upm 20 min) mit Plasmid pASKH9
- Spur 4: Rohextrakt (10000 Upm 20 min) mit Plasmid pASK-IBA5

Aus Abbildung 37 wird deutlich, dass sich auch das FpoF Protein aus *Ms. acetivorans* in *E. coli* BL21 produzieren läßt. Auch befindet sich das überproduzierte Protein nach einem Zentrifugationsschritt bei 10000 Upm für 20 Minuten im Überstand (Abb. 37, Spur 3). Dieser Überstand konnte nun auf die Strep-Tactin-Säule aufgetragen werden.

3.2.2.2 Affinitäts-Chromatographie an Strep-Tactin mit dem FpoF Protein

Der Rohextrakt wurde wiederum aufkonzentriert und 6 ml auf eine mit Puffer W äquilibrierte Strep-Tactin-Säule aufgetragen. Das Säulenvolumen betrug 15 ml und der Auftrag des Rohextraktes erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml pro Minute. Das Protein wurde mit 100 % Puffer E (Puffer W + 2,5 mM Desthiobiotin) von der Säule eluiert. In Abbildung 38 sieht man das Elutionsprofil der Affinitäts-Chromatographie an Strep-Tactin mit dem FpoF Protein.

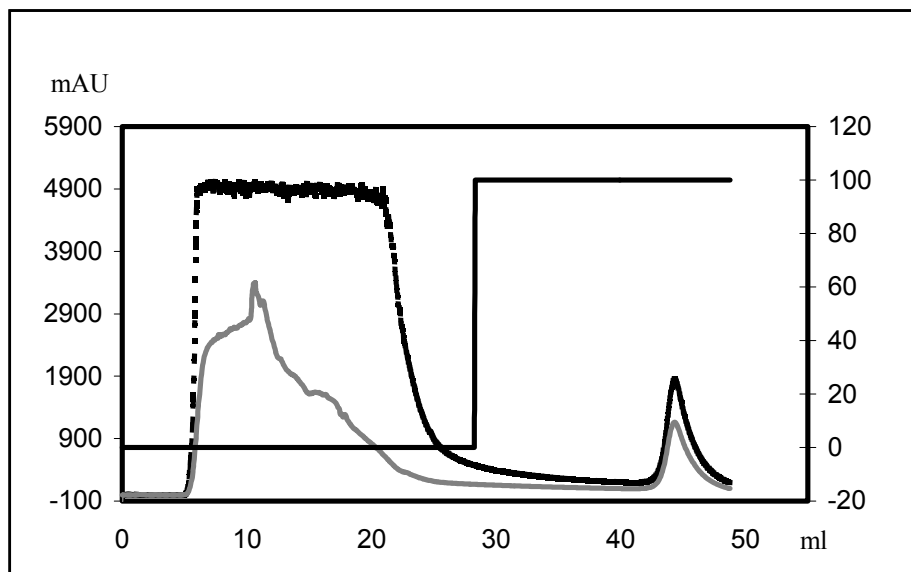


Abb. 38: Affinitäts-Chromatographie an Strep-Tactin mit dem FpoF Protein

UV1 280 nm mAU
 UV2 420 nm mAU ———
 Konzentration Puffer E %B ———

Auch das FpoF Protein eluierte von der Säule, nachdem etwa ein Säulenvolumen Elutionspuffer über die Säule gelaufen war. Jedoch wurde das FpoF Protein nicht so stark produziert wie das FqoF Protein. Aus 6 ml konzentriertem Rohextrakt konnten nur 5 mg Protein gewonnen werden. Auch die starke Absorption bei 420 nm trat wieder auf, was als Indiz für den Einbau der Eisen-Schwefel-Zentren und des FAD angesehen wurde. Die Fraktionen, welche das FpoF-Protein enthielten zeigten eine spezifische Aktivität von bis zu 8 U/mg. Diese Fraktionen wurden vereinigt und einer SDS-PAGE-Analyse unterzogen. Abbildung 39 zeigt ein SDS-Gel mit den Fraktionen der Strep-Tactin-Affinitäts-Chromatographie. In Spur 4 sind noch kontaminierende Proteinbanden zu erkennen. Aus diesem Grund und für den notwendigen Pufferwechsel wurde das Protein einer Gelfiltration mit Superdex 200® unterzogen (Abb. 40). Anhand des Rf-Wertes konnte für die molekulare Masse unter denaturierenden Bedingungen ein Wert von 38 kDa ermittelt werden. Dies entsprach einem um ein kDa geringeren Wert, als die anhand der Aminosäuresequenz ermittelte theoretische Masse von 39 kDa.

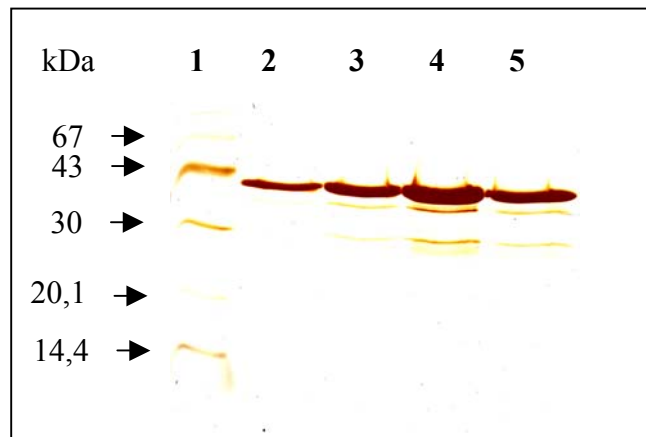


Abb. 39: 16 %ige SDS-Page-Analyse der Strep-Tactin Fraktionen

Spur 1: LMW-Marker

Spur 2-5: Fraktionen der Strep-Tactin-Säule

3.2.2.3 Gelfiltration mit Superdex 200® XK26/90

Die Fraktionen der Strep-Tactin-Säule wurden vereinigt auf 4 ml aufkonzentriert und mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute auf eine vorher mit Tris/NaCl Puffer äquilibrierte Superdex 200® XK26/90 Gelfiltrations-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte isogradisch mit Tris/NaCl Puffer. In Abbildung 40 sieht man das Elutionsprofil dieser Chromatographie. Bei der Gelfiltration des FpoF Proteins zeigte sich ein weiterer Aufreinigungseffekt. Das FpoF Protein eluierte nach 199 ml von der Gelfiltrations-Säule, was einem Verteilungskoeffizienten (K_{av}) von 0,44 und einer molekularen Masse von 41 kDa entspricht. Dieser Wert liegt um 3 kDa über der molekularen Masse von 38 kDa, die unter denaturierenden Bedingungen ermittelt wurde. Bei dem Protein, welches nach 174 ml von der Säule eluierte, handelte es sich um ein Dimer des FpoF Proteins. Die übrigen Peaks repräsentieren Protein-kontaminationen. Die Fraktionen, die nach 199 ml von der Säule eluierten, wurden vereinigt und auf einen Proteingehalt von 15 mg/ml eingestellt. Abbildung 41 zeigt eine SDS-PAGE-Analyse dieses Präparats. Das FpoF Protein war bis zur Homogenität aufgereinigt und konnte so zu Kristallisationsexperimenten eingesetzt werden.

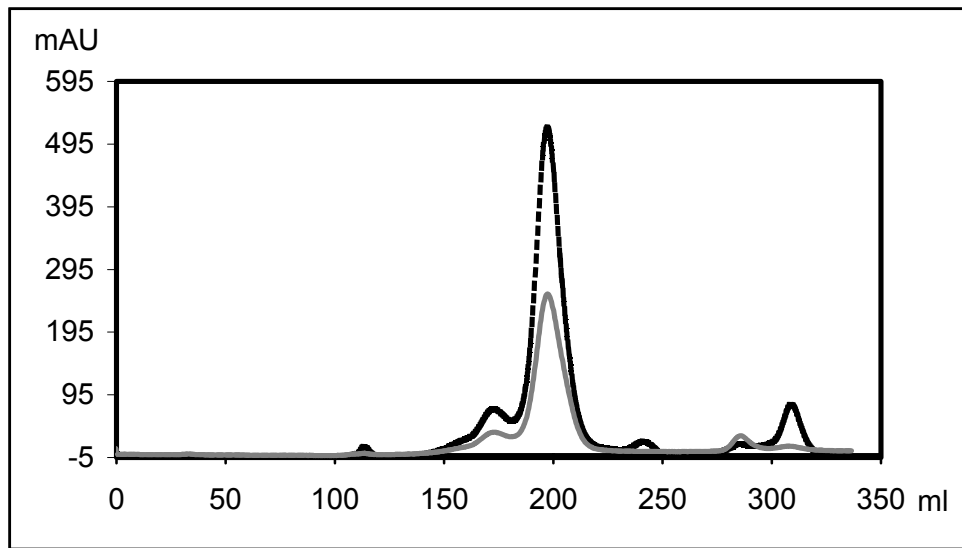


Abb. 40: Gelfiltration des FpoF Proteins mit Superdex 200® XK26/90

UV1 280 nm mAU
 UV2 420 nm mAU ———

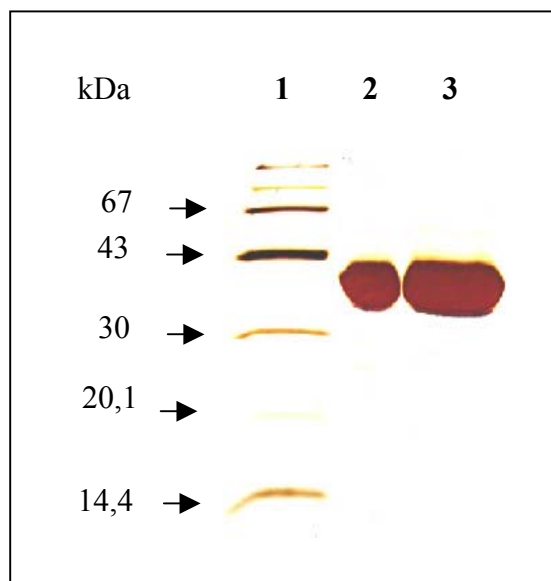


Abb. 41: 16 %ige SDS-Page-Analyse des aufgereinigten FpoF Proteins

Spur 1: LMW-Marker
 Spur 2: 10 µg aufgereinigtes FpoF Protein
 Spur 3: 15 µg aufgereinigtes FpoF Protein

3.2.2.4 Zusammenfassung der Reinigung des FpoF Proteins

Die Tabelle 7 zeigt ein Aufreinigungsprotokoll des FpoF Proteins aus einer 10 Liter Kultur. Das erhaltene Zellpellet wurde in 200 ml Puffer aufgenommen und nach Zellaufschluss und Zentrifugation auf 25 ml aufkonzentriert. Mit diesen 25 ml wurden dann vier Säulenläufe durchgeführt. Aus 10 Litern Zellkultur konnten im Fall des FpoF Proteins lediglich 15 mg Protein mit einer spezifischen Aktivität (siehe 2.14.2) von 10 U/mg, bei Raumtemperatur, gewonnen werden.

Die Ausbeute nach der Gelfiltration lag nur bei 18 %. Dieser relativ geringe Wert ist durch die Tatsache zu erklären, dass das FpoF Protein mit Strep-Tag nur schlecht an das Strep-Tactin-Material band und somit ein beträchtlicher Teil des überproduzierten Proteins im Zuge der Chromatographie verloren ging.

Tabelle 7: Aufreinigungsprotokoll des FpoF Proteins

Aufreinigungs-Schritt	Rohextrakt	Strep-Tactin Pool	Gelfiltrations Pool
Volumen in ml	25	4	1
Gesamt Protein mg	1500	24	15
Protein mg/ml	60	6	15
Spezifische Aktivität U/mg	0,55	9	10
Gesamt-Aktivität in U	825	216	150
Anreicherungs Faktor	1,0	10,6	12
Ausbeute %	100	26	18

3.2.3 Überexpression und Aufreinigung des FpoO Proteins aus *Ms. mazei* Gö1 mittels des Strep-Tag-Systems

Das 15 kDa Protein FpoO aus *Ms. mazei* ist das Genprodukt des *fpoO* Gens, welches sich am Ende des *fpo*-Operons befindet (s. Abb. 66). Es zeigt weder auf Nukleotid- noch auf Aminosäure-Ebene Homologien zu bekannten Genen oder Proteinen. Über die Funktion von FpoO ist nichts bekannt, es verfügt jedoch über Bindemotive für die Koordination von zwei [2Fe-2S]-Zentren. Auch die beiden nah verwandten methanogenen Archaeen *Ms. acetivorans* und *Ms. barkeri* besitzen ein *fpoO* Gen, das wie bei *Ms. mazei* am Ende des *fpo*-Operons lokalisiert. Das Genprodukt des *fpoO* Gens aus *Ms. acetivorans* weist eine 82 %ige bzw. 61 %ige Identität zu den korrespondierenden FpoO-Proteinen aus *Ms. mazei* und *Ms. barkeri* auf.

Über die Funktion und das Vorhandensein des Eisen-Schwefel-Zentrums konnte bisher nur spekuliert werden. Daher wurde das *fpo*-Gen in den Über-expressionsvektor pASK-IBA3 kloniert, der es ermöglicht das FpoO Protein über einen C-terminalen Strep-Tag aufzureinigen. Das aufgereinigt Protein sollte näher charakterisiert werden, um Aufschluss über seine Funktion zu erhalten.

3.2.3.1 Heterologe Überexpression des FpoO Proteins in *E.coli* BL 21(DE3)

Das Plasmid pASKH4 (s. Abb.21) wurde in den *E. coli* Stamm BL 21 transformiert (s. 2.7.4). Genauso wurde mit dem leeren Vektor pASK-IBA3 verfahren. Mit Einzelkolonien wurden Vorkulturen beimpft. Diese dienten dann zum 2 %igen Animpfen der Hauptkultur. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden die Kultur mit AHT (40 µg/ml; s. 2.2.6) induziert und nach Induktion über Nacht am nächsten Morgen geerntet. Nach der Ernte wurde das Zellpellet einer 10 Liter Kultur in 200 ml Puffer W (100 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl) aufgenommen, durch Ultraschall (siehe 2.11.2) aufgeschlossen und zur Abtrennung der Zelltrümmer bei 10000 Upm für 20 Minuten zentrifugiert.

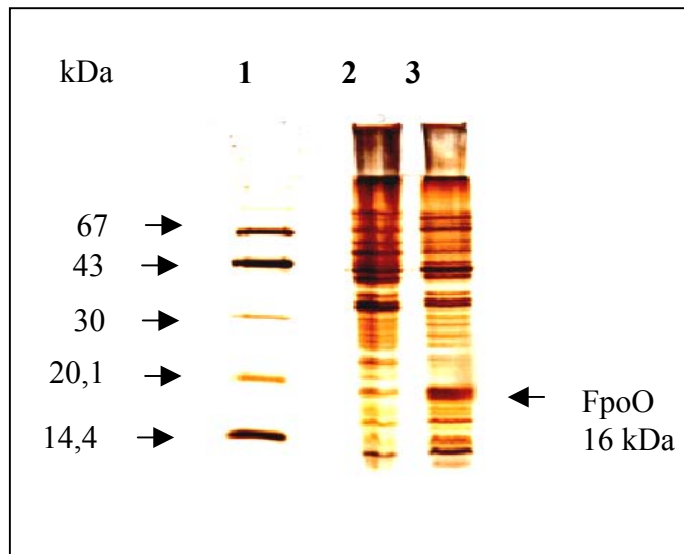


Abb. 42: Überproduktion des FpoO Proteins (16 %ige SDS-Page-Analyse)

- Spur 1: LMW-Marker
- Spur 2: Rohextrakt mit leerem pASK-IBA3 Vektor
- Spur 3: Rohextrakt mit pKH4

In Abbildung 42 ist in Spur drei deutlich eine zusätzliche Protein-Bande bei etwa 16 kDa zu sehen, die im Rohextrakt mit leeren pASK-IBA3 Vektor nicht auftrat. Der Rohextrakt wurde aufkonzentriert und 6 ml dieses Konzentrats zur Affinitäts-Chromatographie mit Strep-Tactin verwendet.

3.2.3.2 Affinitäts-Chromatographie an Strep-Tactin mit dem FpoO Protein

Der Rohextrakt wurde wiederum mit einer Flussrate von 2 ml pro Minute auf eine mit Puffer W äquilibrierte Strep-Tactin-Säule aufgetragen. Das FpoO Protein wurde mit 100 % Puffer E (Puffer W + 2,5 mM Desthiobiotin) von der Säule eluiert. In Abbildung 43 ist das Elutionsprofil der Affinitäts-Chromatographie an Strep-Tactin mit dem FpoO Protein abgebildet.

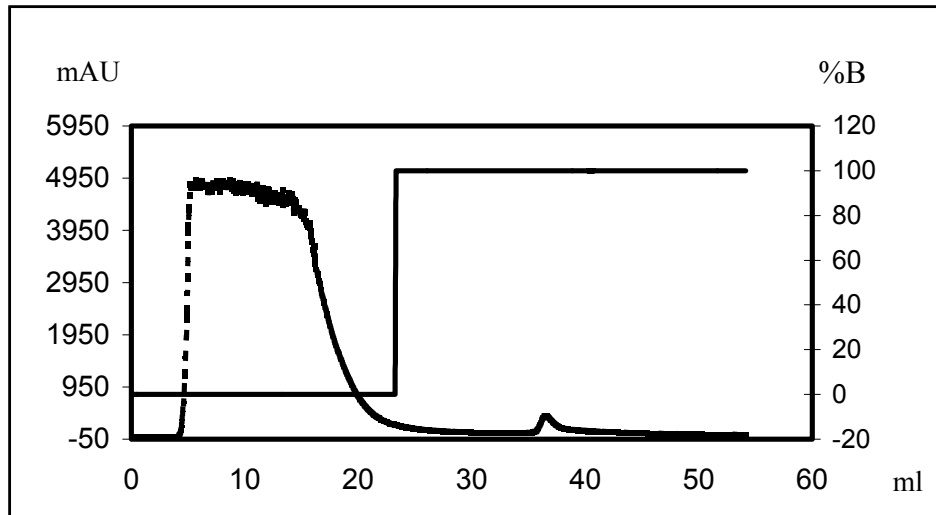


Abb. 43: Affinitäts-Chromatographie an Strep-Tactin mit dem FpoO Protein

UV 280 nm mAU
 Konzentration Puffer E %B ———

Das FpoO Protein zeigte keine Absorption bei 420 nm, was darauf zurückzuführen ist, dass das Protein kein FAD-Bindemotiv besitzt und somit auch kein FAD gebunden werden kann. Aus 6 ml konzentriertem Rohextrakt konnten lediglich 3 mg Protein gewonnen werden. Abbildung 44 zeigt eine SDS-PAGE-Analyse des aufgereinigten FpoO Proteins.

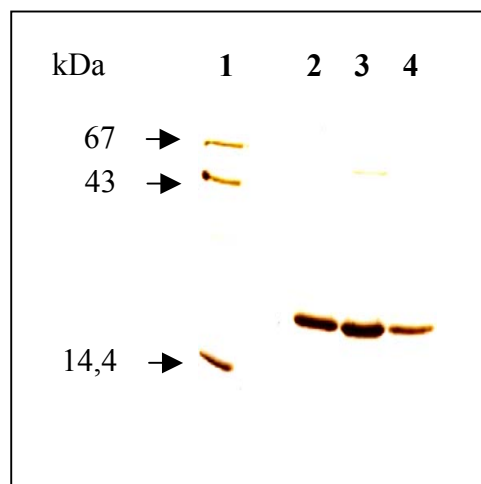


Abb. 44: 16 %ige SDS-Page Analyse des aufgereinigten FpoO Proteins

Spur 1 : LMW-Marker
 Spur 2, 3 und 4 : Fraktionen der Chromatographie mit Strep-Tactin

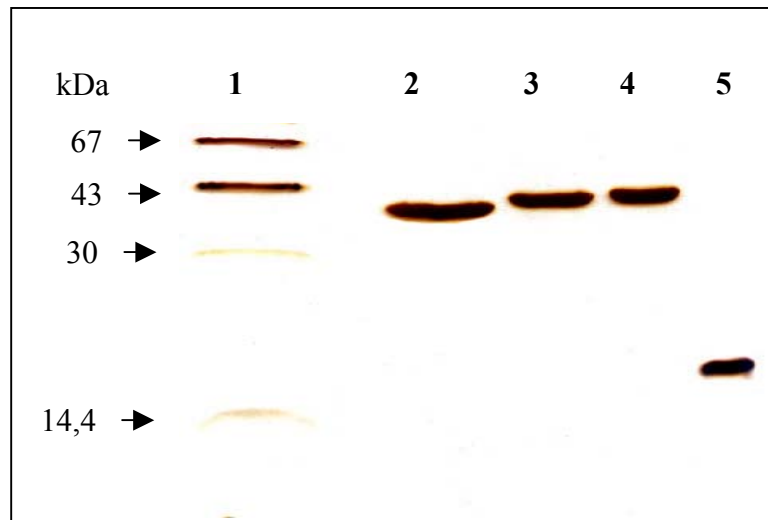
Es wurde Rf-Wert bestimmt und eine molekulare Masse von 16 kDa ermittelt. Die theoretisch ermittelte molekulare Masse betrug 15 kDa. Die Differenz von 1 kDa ist bedingt durch den fusionierten Strep-Tag.

3.2.3.3 Überproduktion und Aufreinigung des FpoO Proteins unter anaeroben Bedingungen

Aus der Bestimmung des Nicht-Häm-Eisens (siehe 3.3.1.1) ging hervor, dass sich dieses im FpoO Protein nur nachweisen ließ, wenn es unter anaeroben Bedingungen expremiert, geerntet und aufgereinigt wurde. Zu diesem Zweck wurde nach Induktion mit AHT das Kulturgefäß mit einem Gummistopfen verschlossen, ebenfalls über Nacht induziert und dann anaerob geerntet. Die Aufreinigung geschah im Anaeroben-Zelt und die Puffer wurden mit 4 mM DTT reduziert. In Abbildung 45 (Spur 5) sieht man das anaerob aufgereinigte Fpo O, welches ebenfalls bis zur Homogenität aufgereinigt werden konnte.

3.2.4 Vergleich der aufgereinigten Untereinheiten

In Abbildung 45 sind die heterolog produzierten Untereinheiten aus *Ms. acetivorans*, *A. fulgidus* und *Ms. mazei* dargestellt. In Spur 1 läuft das mit einem N-terminalen Strep-Tag aufgereinigte FpoF Protein aus *Ms. acetivorans* mit einer molekularen Masse von 38 kDa im denaturierenden SDS-Gel. Direkt daneben (Spur 3) sieht man das FqoF Protein aus *A. fulgidus* mit einer Masse von 39 kDa. Das mit Hilfe des Strep-Tag aufgereinigte FqoF Protein läuft in Spur 4 mit einer molekularen Masse von 40 kDa. Schließlich ist in Spur 5 das über einen C-terminalen Strep-Tag aufgereinigte FpoO Protein aus *Ms. mazei* mit einer Masse von 16 kDa zu sehen.



**Abb. 45: 16 %ige SDS-Page Analyse der aufgereinigten Untereinheiten
5 μ g Protein je Spur**

- Spur 1 : LMW-Marker
- Spur 2 : FpoF Untereinheit mit N-terminalem Strep-Tag
aus *Ms. acetivorans*
- Spur 3 : FqoF Untereinheit aus *A. fulgidus*
- Spur 4 : FqoF Untereinheit mit N-terminalem Strep-Tag
aus *A. fulgidus*
- Spur 5 : FpoO Untereinheit mit C-terminalem Strep-Tag
aus *Ms. mazei*

3.3 Charakterisierung der überproduzierten Untereinheiten der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen

3.3.1 Analyse der Eisen-Schwefel-Zentren der aufgereinigten Untereinheiten

Sowohl die FqoF Untereinheit aus *A. fulgidus* als auch das FpoF Protein aus *Ms. acetivorans* weisen in ihrer Aminosäuresequenz Bindemotive für zwei vierkernige Eisen-Schwefel-Zentren der Art CxxCxxCxxxCP auf (siehe Tab. 10). Diese Bindemotive sind hoch konserviert und befinden sich in beiden Proteinen am Terminus. Auch das FpoO Protein aus *Methanosarcina spec.* hat in seiner Aminosäuresequenz konservierte Cysteine, welche zwei zweikernige Eisen-Schwefel-Zentren koordinieren könnten (CxxC(x)₃₀CxxC und CxxC(x)₂₈CxxC, siehe Tab.10).

3.3.1.1 Bestimmung des Nicht-Häm-Eisen-Gehaltes

Wie in 2.15.4 beschrieben, wurde mit Hilfe einer Standardlösung (0-17,5 nmol Fe^{3+}) eine Eichkurve erstellt (Abb. 46). Der Nicht-Häm-Eisen-Gehalt wurde kolorimetrisch durch Bildung eines Ferrozin-Komplexes und dessen Absorption bei 562 nm bestimmt (FISH, 1988).

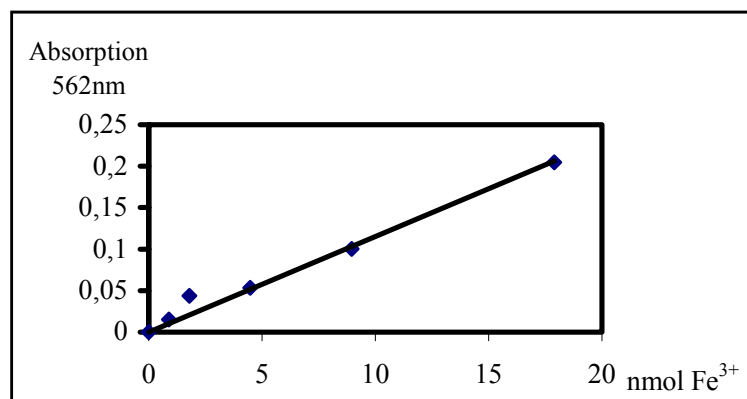


Abb. 46: Eichkurve zur Bestimmung des Nicht-Häm-Eisen-Gehaltes

Hierbei konnten für das FqoF Protein aus *A. fulgidus* durchschnittlich 14 nmol Eisen pro nmol Protein ermittelt werden. Auch für das mit dem Strep-Tag aufgereinigte FqoF Protein konnten beim Einsatz von 0,7 nmol Protein 10 nmol Eisen ermittelt werden. Dies ergab

ebenfalls ein molares Verhältnis von Eisen zu Protein von 14 : 1. Bei dem FpoF Protein aus *Ms. acetivorans* konnten hingegen beim Einsatz von 0,65 nmol Protein lediglich 5,15 nmol Eisen nachgewiesen werden. Hier betrug das molare Verhältnis Eisen zu Protein 8 : 1. Das FpoO Protein aus *Ms. mazei* Gö1, weist Bindemotive für zwei zweikernige Eisen-Schwefel-Zentren auf. Hier wurde ein molares Verhältnis von Eisen zu Protein von 1,6 : 1 nachgewiesen. Auffällig bei diesem Protein war, dass das Eisen-Schwefelzentrum sehr sauerstoffempfindlich ist und der Eisengehalt nur nach einer anaeroben Aufreinigung ermittelt werden konnte.

3.3.1.2 Bestimmung des säurelabilen Schwefels

Auch zur Bestimmung des säurelabilen Schwefels wurde mittels einer Standardlösung (0-50 nmol S^{2-}) eine Eichkurve erstellt, mit der der Gehalt des säurelabilen Schwefels bestimmt werden konnte (Abb. 47). Es wurde vorgegangen, wie unter 2.15.5 beschrieben.

Hierbei konnten für das FqoF Protein aus *A. fulgidus* durchschnittlich 7 nmol Sulfid pro nmol Protein ermittelt werden.

Auch für das mit dem Strep-Tag aufgereinigte FqoF Protein konnten beim Einsatz von 0,45 nmol Protein 3 nmol Sulfid ermittelt werden. Dies ergab ein molares Verhältnis von Sulfid zu Protein von 7 : 1.

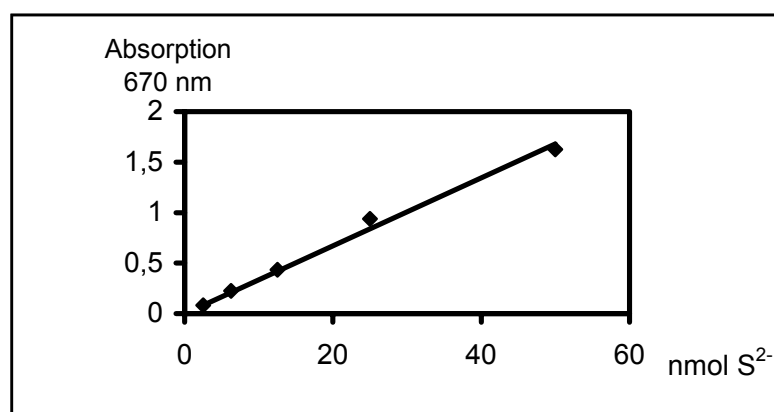


Abb. 47: Eichkurve zur Bestimmung des säurelabilen Schwefels

Bei dem FpoF Protein aus *Ms. acetivorans* konnten hingegen beim Einsatz von 0,65 nmol Protein 5,3 nmol Sulfid nachgewiesen werden. Hier beträgt das molare Verhältnis Sulfid zu Protein 8,2 : 1.

Das FpoO Protein aus *Ms. mazei* Gö1, weist Bindemotive für zwei [2Fe-2S]-Zentren auf. Hier konnte ein molares Verhältnis von Sulfid zu Protein von 1,5 : 1 nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall wurde Schwefel nur in dem anaerob aufgereinigten Protein gefunden.

Bei der Säure-Hydrolyse der Proteine ist es leicht möglich den säurelabilen Schwefelgehalt zu niedrig zu bestimmen, da das S^{2-} als H_2S durch die Säurebehandlung freigesetzt werden kann (BEINERT, 1983). Daher ist vor allem bei den FqoF Proteinen davon auszugehen, dass der Gehalt an säurelabilem Schwefel zu gering bestimmt wurde, da der ermittelte Nicht-Häm-Eisen-Gehalt mit 14 mol pro mol Protein doppelt so hoch ist (siehe Diskussion 4.2.1.2).

3.3.2 Bestimmung des Flavingehalts in den Proteinen FqoF und FpoF

In Proteinen kommen hauptsächlich Riboflavin, Riboflavin-5'-phosphat (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) vor, für die zum Teil Bindemotive aus der Primärsequenz bekannt sind (DYM and EISENBERG, 2001). Meistens werden die Flavine fest aber nicht kovalent an das Protein gebunden. Die Dissoziationskonstante liegt im nanomolarem Bereich. Eine kovalente Bindung wird bei einigen Proteinen über die Methylgruppen an den C8- oder C6-Positionen des Isoalloxazin-Ringsystems hergestellt (MULLER, 1983).

3.3.2.1 UV-Vis spektroskopische Konzentrationsbestimmung von FAD

Zur Bestimmung des Flavingehalts wurden die Proteine wie unter 2.15.3 beschrieben behandelt.

Für das FqoF Protein ergab sich hierbei ein durchschnittlicher Flavingehalt von 0,83 mol FAD pro mol Protein. Bei dem mit dem Strep-Tag aufgereinigten FqoF Protein konnte sogar ein mol FAD pro mol Protein ermittelt werden. Der FAD Gehalt des FpoF Proteins betrug 0,92 mol FAD pro mol Protein. FAD ist von großer Bedeutung, da es die Elektronenübertragung von dem Substrat der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen, dem $F_{420}H_2$, auf die Eisen-Schwefel-Zentren vermittelt. Das Flavin kann im Gegensatz zum F_{420} , welches als obligater Hydrid-Ion-Überträger anzusehen ist, 1-Elektronen-Übergänge katalysieren (WALSH, 1986). Dies ist für die Reduktion der [Fe-S]-Zentren von zentraler Bedeutung, da diese nur 1-Elektronen-Übergänge vermitteln. Auch für die Kristallisationsexperimente war es wichtig, dass die aufgereinigten F Untereinheiten die prosthetischen Gruppen, das FAD

und die Eisen-Schwefel-Zentren enthielten. Da mit Hilfe der 3D-Röntgenstrukturanalyse die Lage und Ausrichtung dieser Gruppen zueinander ermittelt werden sollte.

3.3.3 UV-Vis-Spektren der überproduzierten Proteine FqoF und FpoF

Mittels UV-Vis Spektroskopie sollten die in den aufgereinigten Untereinheiten der $F_{420}H_2$ Dehydrogenasen enthaltenen Redox-Gruppen bei verschiedenen Redoxpotentialen identifiziert werden. Diese Methode wurde unter anderem erfolgreich bei der Charakterisierung bis dato unbekannter Redoxgruppen im Komplex I der Atmungskette aus *Neurospora crassa* (SCHULTE et al., 1998) und *E. coli* (FRIEDRICH et al., 1998) angewandt. In diesem Fall wurden sogenannte UV/Vis-Differenzspektren aufgenommen. Hierzu wurden die Redox-Gruppen der Enzyme vollständig oder teilweise reduziert und dann mit O_2 wieder reoxidiert. Subtrahiert man das UV/Vis Spektrum des oxidierten Enzyms von dem Spektrum des reduzierten Enzyms, erhält man ein für die im Enzym enthaltenen Redox-Gruppen charakteristisches Differenz-Spektrum. Für die F Untereinheiten der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen wurden ebenfalls solche Differenz-Spektren aufgenommen (diese Arbeit). In diesen Proteinen kommen als redox-aktive Gruppen die zwei vierkernigen Eisen-Schwefel-Zentren und das FAD in Frage. Eisen-Schwefel-Proteine mit vierkernigen Eisen-Schwefel-Zentren haben ein charakteristisches Absorptionsspektrum. Die Absorptionsmaxima liegen bei der oxidierten Form $(Fe_4S_4)^{3+}$ bei 325 nm, 385 nm und 450 nm. Die teiloxidierte Form $(Fe_4S_4)^{2+}$ weist zwei Maxima bei 305 nm und 390 nm auf. Bei der reduzierten Form $(Fe_4S_4)^+$ bricht die Absorption zusammen und wird uncharakteristisch (LIPPARD UND BERG, BIOANORGANISCHE CHEMIE 1995).

Ebenso zeigt das gebundene FAD spezifische Absorptionscharakteristika. So hat die oxidierte Form, das Flavin-Benzochinon, Maxima bei 445 nm und 370 nm (GISHLA, 1980). Diese Absorption wird nach Reduktion gebleicht; es entsteht zunächst ein Semichinon bis schließlich die Absorptionseigenschaften gänzlich verloren gehen und das FAD-Hydrochinon vorliegt.

3.3.3.1 UV-Vis Redox-Spektrum des FqoF-Proteins

Das aufgereinigte FqoF Protein aus *A. fulgidus* wurde mit Hilfe von Platin (IV)-oxid und Wasserstoff bei einem pH von 7,5 reduziert (s. 2.15.2) und anschließend mit Luftsauerstoff oxidiert. Nach der Aufnahme der Grundlinie konnte die Änderung des Absorptionsspektrums während der Reduktion und der anschließenden Reoxidation mit O₂ über zwei Stunden mittels eines Dioden-Array-Photometers (Scanintervall: 1,92 s, Integrationszeit: 24 ms, Wellenlängenbereich: 200 bis 700 nm) verfolgt werden. Abbildung 48a zeigt die Änderung des Spektrums der FqoF Untereinheit während der Reduktion und Abbildung 48b zeigt die Änderung des Spektrums während der Reoxidation des reduzierten Proteins. Besonders auffällig war hier die Änderung des Spektrums im Bereich der Wellenlängen 330 nm, 380 nm und 450 nm. Bei den Wellenlängen von 380 und 450 nm absorbierte das gebundene FAD. Durch die Reduktion mit Pt/H₂ wurde die Absorption bei 380 und 450 nm gebleicht (Abb. 48 a). Nach 60 min nahm die Absorption in diesem Bereich nicht weiter ab, das FAD lag nun reduziert als FAD-Hydrochinon vor. Nach Oxidation mit Luftsauerstoff nahm die Absorption im Wellenlängenbereich von 380 und 450 nm wieder zu (Abb. 48 b). Das FAD lag dann nach 120 min in seiner Benzochinon-Form vor. Auch die Eisen-Schwefel-Zentren wurden mit Pt/H₂ reduziert und anschließend mit O₂ wieder reoxidiert. Dies ist aufgrund der Abnahme der Absorption während der Reduktion des Proteins bei 330 nm und der anschließenden Zunahme der Absorption nach Oxidation mit O₂ in diesem Bereich zu vermuten.

Außerdem ließ sich während der Reduktion eine Abnahme der Absorption im Bereich zwischen 550 und 650 nm beobachten. Hierbei könnte es sich um die sogenannte „Charge Transfer Bande“ handeln, welche für Eisen-Schwefel-Zentren und auch für Flavin-Substrat Ladungsinteraktionen beschrieben wurde (HOPKINS und STANLEY, 2003). Da die Absorption des Flavins sehr dominant war, überlagerte diese die der Eisen-Schwefel-Zentren. Dies war insbesondere der Fall bei den Wellenlängen von 385 und 450 nm, wo die oxidierten [4Fe-4S] Zentren ihre Absorptionsmaxima hatten.

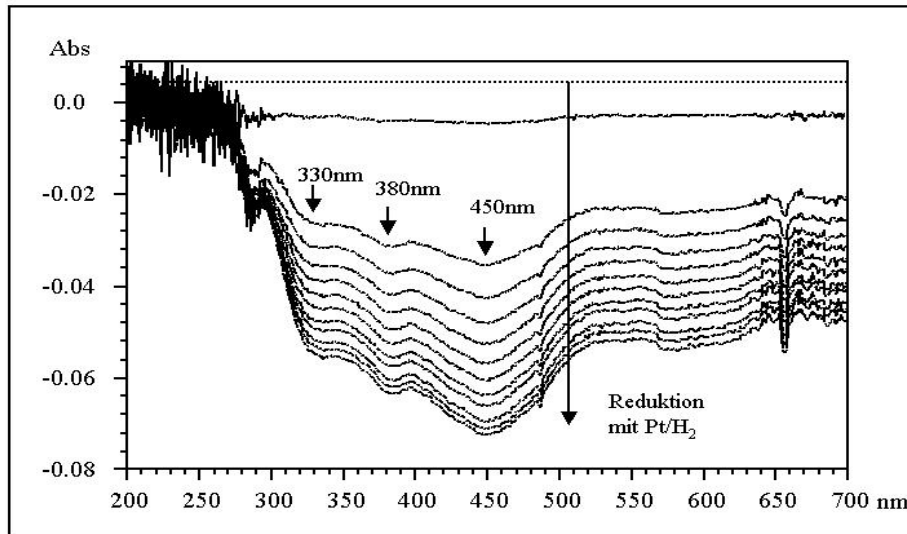


Abb. 48a: Änderung des UV/Vis Spektrums des FqoF Proteins während der Reduktion mit Platin-Wasserstoff

Die Spektren wurden in Intervallen von 5 min über 60 Minuten aufgenommen; die Konzentration des Proteins betrug $19,5 \mu\text{M}$. Die gestrichelte Linie stellt die Grundlinie dar.

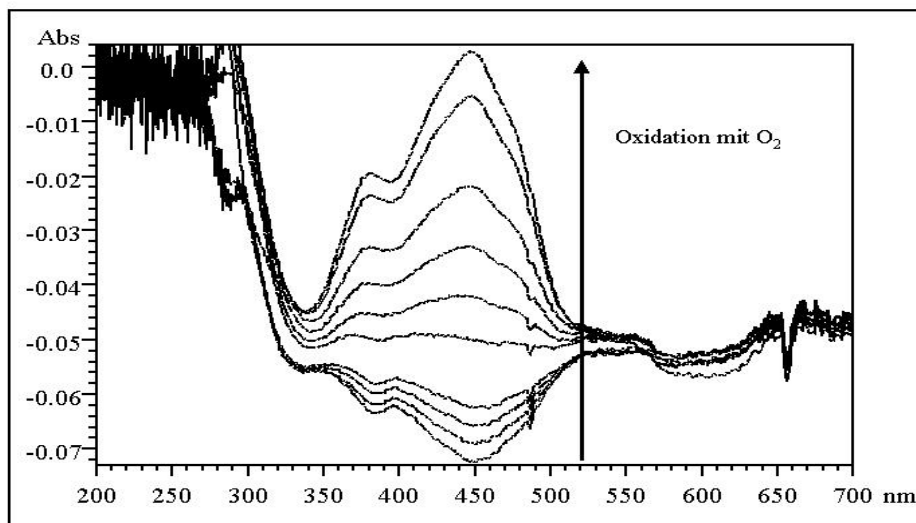


Abb. 48b: Änderung des UV/Vis Spektrums des reduzierten FqoF Proteins während der Reoxidation mit O_2

Ausgehend vom vorangegangenen Experiment wurden Spektren zwischen der 75-igsten und der 120-igsten Minute in Intervallen von 5 min aufgenommen. Die Konzentration des Proteins betrug $19,5 \mu\text{M}$

Durch Subtraktion des Spektrums des oxidierten FqoF Proteins von dem Spektrum des reduzierten Enzyms erhielt man das in Abbildung 49 dargestellte Differenzspektrum. Im UV-Vis Differenzspektrum ist der Anstieg der Absorption bei 380 und 450 nm, der nach der Oxidation des Proteins im Gesamtspektrum (Abb. 48b) zu sehen war, nun als negative

Absorption zu sehen. Neben diesen negativen Absorptionen bei 380 und 450 nm, konnte man eine weitere negative Absorption bei 325 nm ausmachen. Hierbei könnte es sich um die Absorption der oxidierten [4Fe-4S]-Zentren in diesem Wellenlängenbereich handeln.

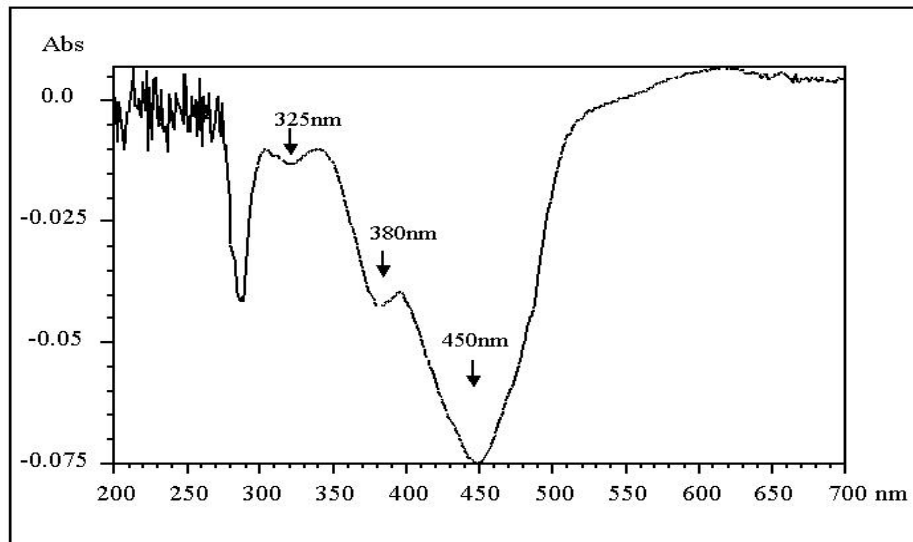


Abb. 49: UV/Vis Differenzspektrum des Platin-Wasserstoff reduzierten FqoF Proteins minus der Sauerstoff-oxidierten Form

Es wurden 19,5 nmol Protein/ml im Experiment eingesetzt. Das Differenz-Spektrum ergab sich aus der Differenz der Spektren nach 60 min (red.) und 120 min (ox.).

Auch für das sogenannte NADH-Dehydrogenase-Fragment des Komplex I aus *E. coli* wurden UV/Vis Differenz-Spektren aufgenommen (RASMUSSEN et al. 2001). Das NADH-Dehydrogenase-Fragment besteht aus drei Untereinheiten (NuoE NuoF und NuoG, siehe 4.2.1), welche zusammen drei [2Fe-2S]-Zentren, drei [4Fe-4S]-Zentren und ein FMN binden. Das Differenz-Spektrum des NADH-Dehydrogenase-Fragments wird ebenfalls durch die Absorption des gebundenen Flavins, in diesem Fall FMN, bei 370 und 455 nm dominiert. Neben einer schwachen Absorption der zweikernigen Eisen-Schwefel Zentren bei 420, 470, und 560 nm tritt für die [4Fe-4S]-Zentren eine Absorption bei 420 nm und eine Schulter bei 400 nm auf (RASMUSSEN et al., 2001). Die Absorption bei 420 nm konnte bei dem FqoF Protein nicht beobachtet werden. Jedoch zeigte sich auch im Redox-Differenz-Spektrum des FqoF Proteins eine deutliche Schulter bei 400 nm. Eine weitere Schulter war bei 350 nm zu beobachten. Die negativen Absorptionen bei 325, 380 und 450 nm im Differenz-Spektrum in Abbildung 49 entsprachen der Absorptionzunahme der redox-aktiven Gruppen im FqoF

Protein während der Oxidation mit O_2 . Die Absorptionsmaxima der oxidierten Form des FAD (370 und 445 nm), und die der oxidierten [4Fe-4S]-Zentren (325, 385 und 450 nm) lagen sehr nahe beieinander. Daher ließen sich die ermittelten Absorptionsmaxima bei 380 und 450 nm nicht eindeutig einer Gruppe zuordnen. Die Änderung der Absorption bei 325-330 nm konnte jedoch der Absorption der vierkernigen Eisen-Schwefelzentren in diesem Bereich zugeordnet werden.

3.3.3.2 UV-Vis Redox-Spektrum des FpoF-Proteins

Das FpoF Protein aus *Ms. acetivorans* wurde ebenso wie das FqoF Enzym aus *A. fulgidus* mit Platin (IV)-oxid und Wasserstoff bei einem pH von 7,5 reduziert (s. 2.15.2) und anschließend mit O_2 oxidiert. Nach der Aufnahme der Grundlinie konnte auch bei diesem Enzym die Änderung des Absorptionsspektrums während der Reduktion und der folgenden Oxidation mit Luftsauerstoff über zwei Stunden mit dem Dioden-Array-Photometer verfolgt werden (Abb. 50a/b). Die Einstellungen des Photometers wurden, wie unter 3.3.3.1 beschrieben, beibehalten.

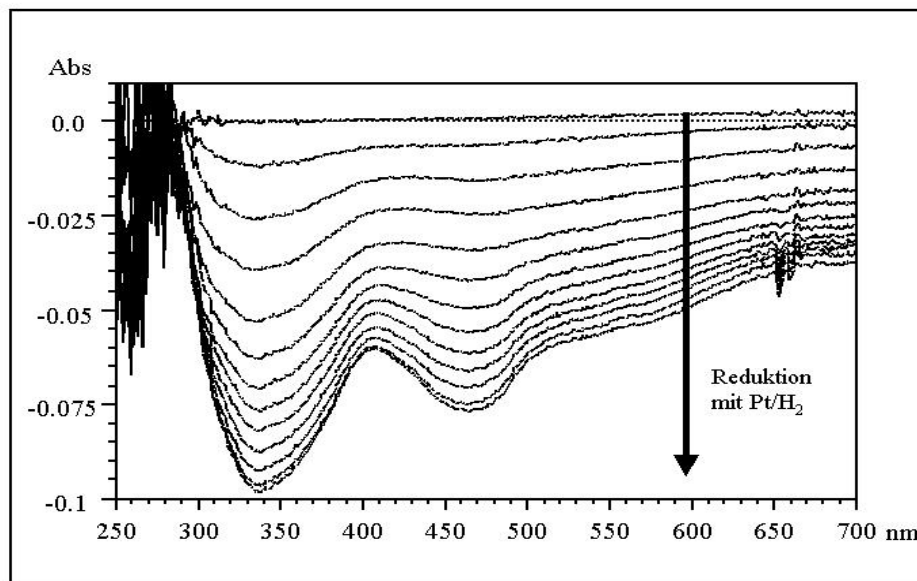


Abb.50a: Änderung des UV/Vis Spektrums des FpoF Proteins: während der Reduktion mit Platin-Wasserstoff über 60 Minuten.

Es wurden 12,6 nmol Protein/ml im Experiment eingesetzt und Spektren in Intervallen von 5 Minuten aufgenommen.

Auch die F Untereinheit der $F_{420}H_2$ Dehydrogenase aus *Ms. acetivorans* ließ sich mit Platin/ H_2 reduzieren und mit Luftsauerstoff wieder reoxidieren. Anders als bei der F

Untereinheit aus *A. fulgidus*, deren Absorptionspeaks bei 370 und 450 nm durch Reduktion verschwanden, wurde die Absorption der FpoF Untereinheit durch Reduktion bei 340 und 460 nm gebleicht (Abb. 50 a). Die Absorption bei 340 und 460 nm erreichte nach 60 Minuten Reduktion ihr Minimum (Abb. 50 a). Es konnte davon ausgegangen werden, dass die redox-aktiven Gruppen des FpoF Proteins, das FAD und die zwei [4Fe-4S]-Zentren nun reduziert vorlagen. Auffällig bei der Reduktion des FpoF Proteins war, dass es im Gegensatz zur FqoF Untereinheit nicht zur Ausbildung einer Schulter bei 350 nm kam. Die Absorption wurde vielmehr über einen großen Bereich von 320 nm bis 370 nm gebleicht. Die Schulter bei 400 nm war allerdings ebenfalls vorhanden. Wurde das reduzierte Protein anschließend mit O₂ reoxidiert, kam es zu einer Absorptionzunahme bei den vorher durch Reduktion gebleichten Wellenlängenbereichen (Abb. 50b).

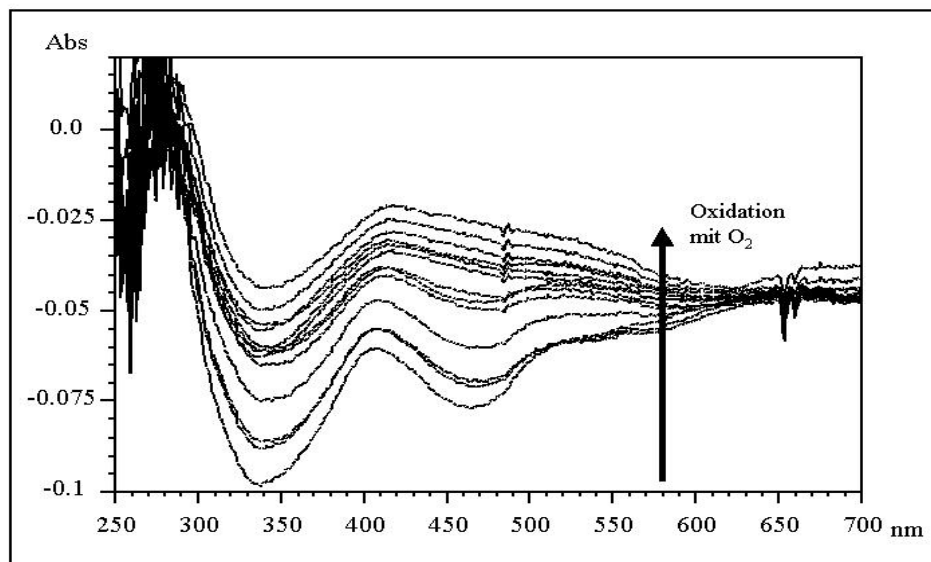


Abb. 50b: Änderung des UV/Vis Spektrums des reduzierten FpoF Proteins während der Reoxidation mit O₂

Es wurden 12,6 nmol Protein/ml im Experiment eingesetzt. Die Spektren wurden in Intervallen von 5 min von der 60igsten bis zur 120igsten Minute aufgenommen.

Nach 120 Minuten konnte keine weitere Absorptionzunahme verzeichnet werden. Das FAD und die Eisen-Schwefel-Zentren lagen nun in ihrer oxidierten Form vor. Die beobachteten Absorptionsänderungen im UV-Vis Spektrum des FpoF Proteins waren, wie im Fall des FqoF Proteins, dem gebundenen FAD und den [4Fe-4S]-Zentren zuzuschreiben. Jedoch kam es bei der FpoF Untereinheit der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *Ms. acetivorans* zu einer stärkeren Überlagerung der Absorption des FAD und der Eisen-Schwefel-Zentren im Bereich zwischen 320 und 380 nm als dies bei dem Protein aus *A. fulgidus* der Fall war.

Das UV-Vis Differenz-Spektrum in Abbildung 51 ergab sich aus der Subtraktion des Spektrums des oxidierten FpoF Proteins von dem Spektrum des reduzierten Proteins.

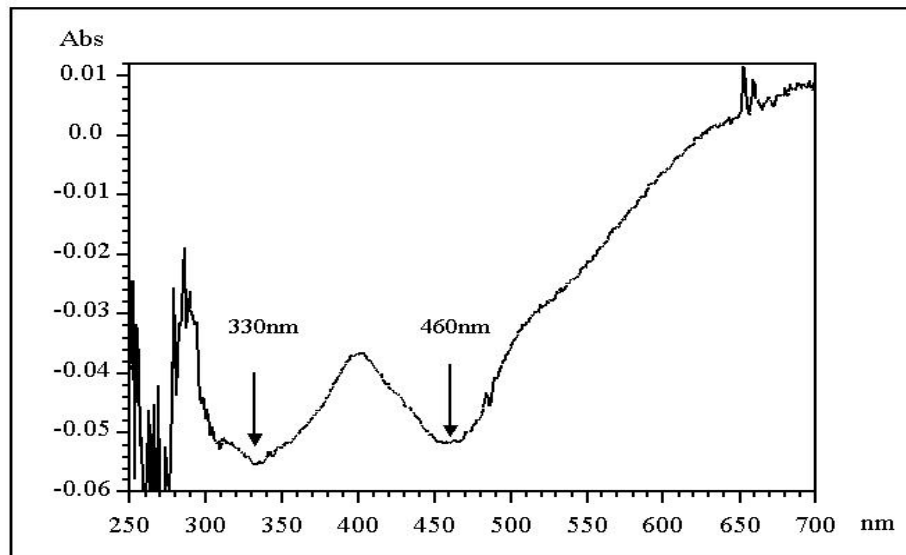


Abb. 51: UV/Vis Differenzspektrum des Platin-Wasserstoff reduzierten FpoF Proteins minus der Sauerstoff-oxidierten Form

Die Reduktion des Proteins in einer Konzentration von $12,6 \mu\text{M}$ erfolgte mittels Platinoxid/ H_2 und die Oxidation mit Hilfe von O_2 . Das Differenz-Spektrum ergab sich aus der Differenz der Spektren nach 60 min (red.) und 120 min (ox.).

Im Differenz-Spektrum erschien die Zunahme der Absorption, die nach der Oxidation des reduzierten Proteins im Gesamtspektrum zu verzeichnen war, als negative Absorption. Das Differenzspektrum des FpoF Proteins zeigte eine negative Absorption im Bereich zwischen 320 und 380 nm mit Minima bei 330 nm und 460 nm. In diesen Wellenlängenbereichen absorbieren sowohl die oxidierte Form des FAD als auch die vierkernigen [Fe-S]-Zentren. Im Gegensatz zum FqoF Protein, konnte im Differenz-Spektrum der FpoF Untereinheit nur eine sehr schwach ausgeprägte Schulter bei 350 nm beobachtet werden. Die Schulter bei 400 nm ließ sich hingegen auch im FpoF Protein beobachten.

Beide F Untereinheiten der F_{420}H_2 Dehydrogenasen, sowohl die aus *A. fulgidus*, wie auch die aus *Ms. acetivorans* konnten mit Pt/H_2 reduziert und mit O_2 wieder reoxidiert werden. Es konnten die für die im Enzym enthaltenen Redoxgruppen typischen Redox-Spektren aufgenommen werden. So hatte das gebundene FAD bei beiden Enzymen im oxidierten Zustand ein Absorptionsmaximum im Bereich von 380 nm und ein weiteres Maximum im

Bereich zwischen 350 und 360 nm. Die zwei [4Fe-4S]-Zentren zeigten im oxidierten Zustand Absorptionsmaxima bei 325 nm, 385 nm und bei 450 nm. Dabei ließ sich nur das Absorptionsmaximum bei 325 nm klar den vierkernigen Eisenschwefelzentren zuordnen. Die Maxima bei 385 und 450 nm wurden durch die Absorption des FAD überlagert. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass sich die zwei vierkernigen Eisen-Schwefel-Zentren der Nuo I Untereinheit (Cluster N6a/N6b, siehe 4.2.2) des Komplex I aus *E. coli* und *Neurospora crassa* nicht mittels EPR-Spektroskopie detektieren ließen, sondern mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie identifiziert wurden. Diese [4Fe-4S]-Zentren zeigten im Differenzspektrum eine negative Absorption bei 325-330 nm und bei 425 nm (RASMUSSEN et al., 2001; DUARTE et al., 2002). Das Absorptions-minimum im Bereich von 325-330 nm konnte auch in den F-Untereinheiten der F₄₂₀H₂ Dehydrogenasen aus *A. fulgidus* und *Ms. acetivorans* beobachtet werden.

3.3.3.3 UV-Vis Redox-Spektren des FpoO-Proteins

Es wurde ebenfalls versucht, Redox-Spektren des FpoO Proteins aus *Ms. mazei* aufzunehmen, jedoch erwies sich das zweikernige Eisen-Schwefel-Zentrum als zu labil gegenüber Luftsauerstoff und wurde schnell zerstört. Auch die Strategie einer Reduktion mittels der CO-Dehydrogenase aus *Ms. thermophila* führte nicht zum Erfolg, so dass keine verwertbaren Spektren aufgenommen werden konnten. Hier lag die Vermutung nahe, dass der Eisengehalt im FpoO Protein zu gering war.

3.3.4 EPR-Spektren des Inputmoduls der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase

Die EPR-Spektroskopie (Electron Paramagnetic Resonance) ermöglicht die Detektion von ungepaarten Elektronen (siehe 2.16). Übergangsmetallionen und ihre Komplexe von Metallzentren weisen mehrere ungepaarte Elektronen auf, deren Spins bei starkem elektrischen Kristallfeld maximal gepaart oder bei schwachem Kristallfeld maximal ungepaart sein können. Metallzentren mit einzelnen Elektronen in d-Orbitalen besitzen aufgrund der ausgeprägten Spin-Bahn-Wechselwirkung häufig unterschiedliche g-Faktoren, welche als Unterscheidungsmerkmal verwendet werden können. So kennt man für eine Reihe verschiedenster Eisen-Schwefel-Zentren EPR-Spektren mit charakteristischen g-Werten. Hierbei handelt es sich meist um rhombische- oder axiale EPR-Signale (siehe 2.16). Die Detektion eines axialen, rhombischen oder isotropen Signals erlaubt Aussagen über die Struktur des Metallzentrums innerhalb des Proteins.

Mittels EPR-Spektroskopie konnten die individuellen Signale der verschiedenen Redox-Zentren des Komplex I der Atmungskette detektiert und aufgelöst werden. Alle Eisen-Schwefel-Zentren des Komplex I sind in der reduzierten Form paramagnetisch und somit EPR-detektierbar. Das im Komplex I enthaltene Flavin und das Chinon sind beide in ihrem Zustand als freie Radikale, als Semiflavin oder Semichinon, detektierbar und zeigen isotrope Signale mit einem g-Wert von $g = 2,005$ (OHNISHI, 1998). Nach der von OHNISHI vorgeschlagenen Nomenklatur, werden die Eisen-Schwefel-Zentren des Komplex I als Cluster N1a, N1b, N2, N3, N4 und N5 bezeichnet. N1a und N1b sind zweikernige Eisen-Schwefel-Zentren, bei den übrigen handelt es sich um [4Fe-4S]-Zentren. Neben diesen sechs EPR-detektierbaren Eisen-Schwefel-Zentren ließen sich zwei weitere [4Fe-4S]-Zentren nur mittels UV/Vis-Spektroskopie identifizieren und wurden als Cluster N6a und N6b bezeichnet (FRIEDRICH et al., 2000; RASMUSSEN et al., 2001).

Von den F-Untereinheiten der $F_{420}H_2$ Dehydrogenasen aus *A. fulgidus* und *Ms. acetivorans* sollten ebenfalls EPR-Spektren aufgenommen werden, um die in diesen Untereinheiten enthaltenen [4Fe-4S]-Zentren näher zu charakterisieren. Die EPR-Spektren (siehe 2.16.) wurden am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thorsten Friedrich aufgenommen.

Es muss jedoch an dieser Stelle erwähnt werden, dass die nachfolgend dargestellten Ergebnisse der EPR-Analysen noch nicht abgeschlossen sind. Um eindeutige Aussagen über die Zuordnungen der ermittelten g-Werte zu machen, müssten weitere EPR Spektren mit genaueren Leistungs- und Temperaturtitrationen durchgeführt werden. Jedoch sind die Spektren sehr wohl geeignet, einen ersten Überblick über die vorliegenden Eisen-Schwefel-Zentren der aufgereinigten Untereinheiten der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase zu bekommen.

3.3.4.1 EPR-Spektrum des FqoF Proteins

Die EPR-Spektren der FqoF Untereinheit der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *A. fulgidus* wurden unter zwei verschiedenen Bedingungen aufgenommen. Das Protein mit einer Konzentration von 300 µM wurde mit einem Überschuß an Natrium-Dithionit reduziert, in Quarzglasröhrchen (300 µl) überführt, mit Hilfe von flüssigen Stickstoff bei 77 K eingefroren und dann der EPR-Spektroskopie unterzogen. Außerdem wurde auch noch das aufgereinigte, nicht reduzierte Protein untersucht. In Abbildung 52 ist das EPR-Spektrum des oxidierten FqoF Proteins (wie isoliert) dargestellt. Da vierkernige Eisen-Schwefel-Zentren über eine extrem kurze Relaxations-Zeit verfügen, sind ihre EPR-Signale nur bei Temperaturen unter 20 K detektierbar. Das Spektrum wurde daher bei einer Temperatur von 13 K und einer Mikrowellenleistung von 2 mW aufgenommen. Schon im oxidierten Zustand wies die FqoF Untereinheit ein Signal für ein axiales vierkerniges Eisen-Schwefel-Zentrum auf. Dies war besonders auffällig, da es im oxidierten Zustand paramagnetisches Verhalten zeigte (Abb. 52). Die paramagnetischen Signale für das axiale [4Fe-4S]-Zentrum, mit den g-Werten $g_{x/y} = 2.025$ und $g_z = 2.04$, verschwanden nach Reduktion mit Natrium-Dithionit wieder und wurden diamagnetisch (Abb. 53 a/b).

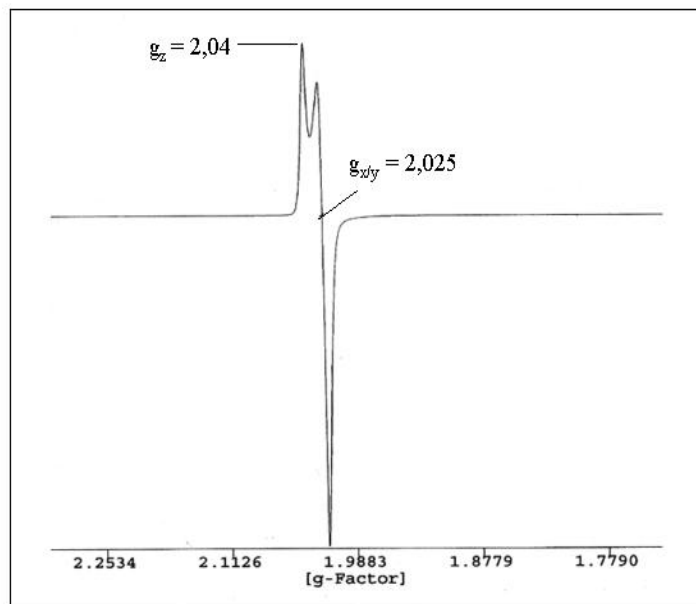


Abb. 52: EPR Spektrum des aufgereinigten FqoF Proteins in der oxidierten Form (wie isoliert)

Die Proteinkonzentration betrug 300 μM ; das Spektrum wurde bei 13 K und einer Mikrowellenleistung von 2 mW aufgenommen; die weiteren EPR Parameter waren: Mikrowellenfrequenz: 9,46 GHz; Modulations-Amplitude: 5 G; Zeitkonstante: 0,164 s

Nach Reduktion des FqoF Proteins mit Natrium-Dithionit (s. Abb. 53a/b) konnten Signale für drei [4Fe-4S]-Zentren beobachtet werden, wobei zwei starke und ein schwaches Signal auftraten. Das in Abbildung 53a dargestellte Spektrum wurde bei einer Temperatur von 13 K und einer Mikrowellenleistung von 5 mW aufgenommen. Unter diesen EPR Bedingungen konnten die g_z -Werte 2,023 und 2,037 ermittelt werden. Außerdem zeigte sich ein starkes isotropes Signal mit einem g -Wert von 2,006. Dieser g -Wert ist typisch für ein Radikal. Es könnte sich dabei um ein Semichinon-FAD handeln (PALMER et al., 1971). Nach einer Erhöhung der Mikrowellenleistung auf 50 mW (Abb. 53b) konnte ein komplexeres EPR Spektrum aufgenommen werden. Es wurden weitere Signale mit den g -Werten von $g_z = 2,056$, $g_x = 1,92$, $g_x = 1,88$ und $g_x = 1,86$ detektiert.

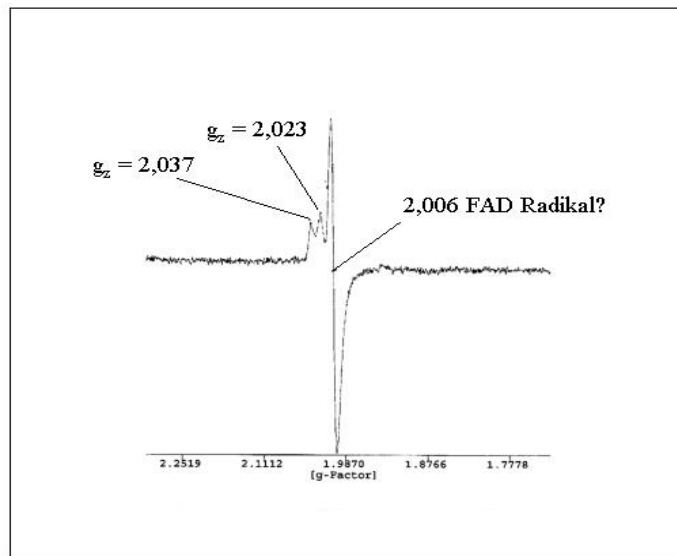


Abb. 53a: EPR Spektrum des Natrium-Dithionit reduzierten FqoF Proteins bei einer Mikrowellenleistung von 5 mW

Die Proteinkonzentration betrug 300 μM ; Das Spektrum wurde bei einer Temperatur von 13 K. Die weiteren EPR Parameter wurden beibehalten

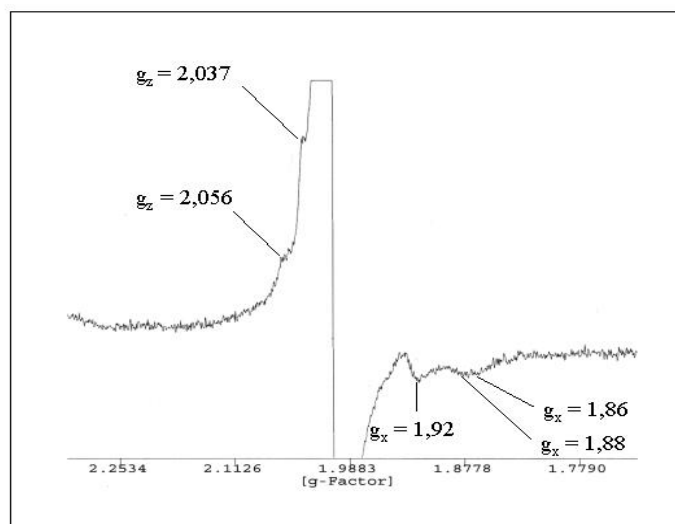


Abb. 53b: EPR Spektrum des Natrium-Dithionit reduzierten FqoF Proteins bei einer Mikrowellenleistung von 50 mW

Die Proteinkonzentration betrug 300 μM ; das Spektrum wurde bei einer Temperatur von 13 K aufgenommen. Die weiteren EPR Parameter wurden beibehalten

Bei den detektierten starken Signalen mit g-Werten von $g_z = 2.023$, $g_x = 1.92$ und $g_z = 2.037$, $g_x = 1.88$ und dem schwachen Signal $g_z = 2.056$, $g_x = 1.86$, handelt es sich um rhombische EPR-Signale, wobei das Signal für den zugehörigen g_y -Wert nicht zu erkennen war, da es sich vermutlich unter dem Radikal-Signal ($g = 2.006$) verbarg.

3.3.4.2 EPR-Spektrum des Fpo F Proteins

Auch von dem FpoF Proteins aus *Ms. acetivorans* wurden EPR-Spektren in der reduzierten und in der oxidierten Form aufgenommen. Wie bei dem FqoF Protein aus *A. fulgidus* zeigte auch das FpoF Protein schon im oxidierten Zustand paramagnetisches Verhalten. Im EPR-Spektrum des oxidierten FpoF Proteins, bei einer Temperatur von 13 K und einer Mikrowellenleistung von 20 mW, konnte ein EPR-Signal für ein axiales vierkerniges Eisen-Schwefel-Zentrum detektiert werden (Abb. 54).

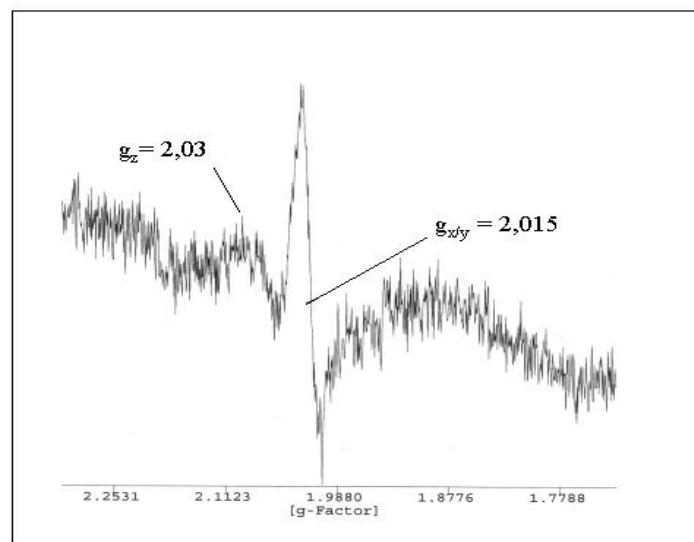


Abb. 54: EPR Spektrum des aufgereinigten FpoF Proteins in der oxidierten Form
Die Proteinkonzentration betrug 150 μM ; das Spektrum wurde bei einer Temperatur von 13 K und einer Mikrowellenleistung von 20 mW aufgenommen. Die weiteren EPR Parameter waren: Mikrowellen-frequenz: 9,46 GHz; Modulations-Amplitude: 5 G; Zeitkonstante: 0,164s

Das axiale EPR-Signal, mit g-Werten von: $g_z = 2,03$ und $g_{x/y} = 2,015$ konnte, wie bei dem FqoF Protein, nur im oxidierten Zustand des Proteins beobachtet werden. Nach der Reduktion des FpoF Proteins mit Natrium-Dithionit, wurde das in Abbildung 55 dargestellte EPR-Spektrum, bei einer Temperatur von 13 K und einer Mikrowellenleistung von 50 mW,

aufgenommen. Das Spektrum des reduzierten Proteins zeigte Signale für zwei vierkernige Eisen-Schwefel-Zentren. Das rhombische EPR-Signal mit den g -Werten $g_z = 2.04$, $g_y = 1.93$, $g_x = 1.86$ zeigte die für reduzierte Kubane typischen Signale mit einem g -Wert über $g = 2,0$ und zwei g -Werten unter $g = 2,0$. Für das axiale EPR-Signal konnte nur der Wert: $g_z = 2.066$ ermittelt werden. Das Signal für den $g_{x/y}$ -Wert verbarg sich unter dem Radikal-Signal ($g = 2.006$).

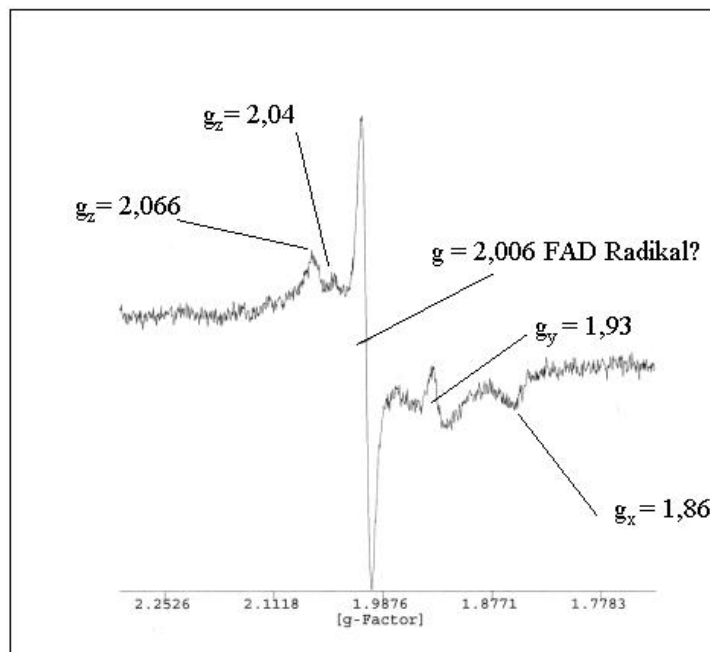


Abb. 55: EPR Spektrum des Natrium-Dithionit reduzierten FpoF Proteins

Die Proteinkonzentration betrug $150 \mu\text{M}$; Das Spektrum wurde bei einer Temperatur von 13 K und einer Mikrowellenleistung von 50 mW aufgenommen. Die weiteren EPR Parameter wurden beibehalten

Genau wie bei der FqoF Untereinheit aus *A. fulgidus* ließ sich auch im EPR-Spektrum des reduzierten FpoF Proteins ein isotropes EPR-Signal mit einem g -Wert von 2,006 detektieren. Auch in diesem Fall könnte es sich um ein, durch die Reduktion mit Natrium-Dithionit erzeugtes FAD-Semichinon handeln. Im Gegensatz zu dem *A. fulgidus* Protein wurden jedoch nach Reduktion nur zwei EPR-Signale für ein axiales und ein rhombisches [4Fe-4S]-Zentrum detektiert.

3.3.5 EPR-Spektrum des FpoO Proteins

Das FpoO Protein aus *Ms. mazei* weist in seiner Aminosäuresequenz Bindemotive für die Koordination von zwei [2Fe-2S]-Zentren auf. Da schon während der Aufreinigung beobachtet werden konnte, dass die Eisen-Schwefel-Zentren der FpoO Untereinheit gegenüber Sauerstoff sehr instabil sind, wurde die Probenvorbereitung für die Aufnahme der EPR-Spektren komplett im Anaeroben-Zelt unter einer Stickstoff-Atmosphäre durchgeführt. So wurde auch der Ansatz des „oxidierten“ Proteins unter anaeroben Bedingungen im Anaeroben-Zelt vorbereitet.

Das FpoO Protein zeigte im oxidierten Zustand kein paramagnetisches Verhalten, somit war auch kein EPR Signal detektierbar. Da [2Fe-2S]-Zentren im Vergleich zu vierkernigen Eisen-Schwefel-Zentren eine längere Spin-Relaxations-Zeit besitzen, können diese schon bei Temperaturen oberhalb von 40 K im EPR-Spektrum detektiert werden. Zum Nachweis von [4Fe-4S]-Zentren sind Temperaturen unterhalb von 20 K notwendig. Aufgrund dieser Temperaturabhängigkeit bei der Aufnahme von EPR-Spektren, kann eine Differenzierung der verschiedenen [Fe-S]-Zentren erfolgen (GAYDA et al., 1976; CAMMACK und SYKES, 1999).

Nach Reduktion mit Natrium-Dithionit wurde das EPR-Spektrum des reduzierten FpoO Proteins bei einer Temperatur von 40 K und einer Mikrowellenleistung von 20 mW aufgenommen (Abb. 56). Es konnte ein Signal für ein, vermutlich axiales zweikerniges Eisen-Schwefel-Zentrum detektiert werden. Es wurde jedoch nur ein g_z -Wert von 2,035 ermittelt. Die Signale für den $g_{x/y}$ Wert befanden sich vermutlich unter dem Radikal-Signal des Redoxmediators.

Aufgrund des sehr geringen [Fe-S]- Gehaltes der Probe, muß die Aussage über die Art des [2Fe-2S]-Zentrums als vorläufig angesehen werden. Es ist jedoch sicher, dass es sich bei dem detektierten [Fe-S]-Zentrum um ein zweikerniges [Fe-S]-Zentrum handelte.

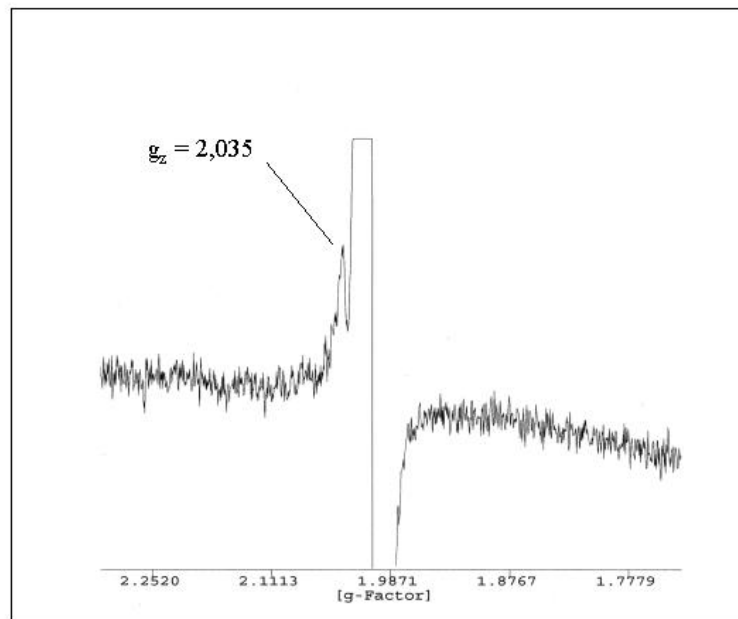


Abb. 56: EPR Spektrum des Natrium-Dithionit reduzierten FpoO Proteins
Die Proteinkonzentration betrug 100 μM ; Das Spektrum wurde bei einer Temperatur von 40 K und einer Mikrowellenleistung von 20 mW aufgenommen; Die weiteren EPR Parameter waren: Mikrowellenfrequenz 9,46 GHz; Modulations-Amplitude 5 G; Zeitkonstante 0,164 s

3.3.6 DNA-Bindestudien mit dem FpoO Protein

Das für das FpoO Protein aus *Ms. mazei* codierende Gen ist am Ende des *fpo*-Operons lokalisiert und weist keine Ähnlichkeit zu bekannten Genen oder Proteinen auf. Die FpoO Untereinheit weist jedoch Bindemotive für zwei [2Fe-2S]-Zentren auf und könnte ähnlich, wie das FNR Protein aus *E.coli* (BEINERT et al., 1997), als O₂ sensitiver Transkriptions-Regulator fungieren. Um eine eventuelle regulatorische Funktion des FpoO Proteins auszuschließen oder zu bestätigen, wurden sogenannte Gelretardations-Experimente (siehe 2.18) ('mobility shift') durchgeführt (AUSUBEL et al., 1988; modifiziert). Da vermutet wurde, dass das FpoO-Protein eine regulatorische Funktion auf die Transkription der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase-Gene ausübt, wurde der Promotor-Bereich des *fpo*-Operons und der Promotor-Bereich des *fpoF*-Gens, welches nicht im *fpo*-Operon organisiert ist, mittels PCR amplifiziert (siehe 2.5). Mit den Primer-Paaren (*fpo* promo fw1/*fpo* promo rev und *fpo* promo fw2/*fpo* promo rev) wurde ein 208 und ein 400 bp großes DNA-Fragment des Promotorbereichs des *fpo*-Operons erzeugt. Mit dem Primer-Paar (*fpoF* promo fw/ *fpoF* promo rev) wurde ein 177 bp großes Fragment des Promotor-Bereichs des *fpoF* Gens amplifiziert (siehe Tab. 4 und Abb. 57/58). Mit den so erhaltenen DNA-Fragmenten und dem anaerob aufgereinigten FpoO Protein wurden DNA-Bindestudien durchgeführt. Da bekannt war, dass das Eisen-Schwefel-Zentrum des FpoO Proteins besonders labil gegenüber O₂ ist (siehe 3.3.1.1 und 3.3.1.2), wurde das FpoO Protein unter anaeroben Bedingungen aufgereinigt und die Bindeansätze (siehe 2.18) unter Stickstoff-Atmosphäre im Anaeroben-Zelt durchgeführt. Auch das FNR Protein kann nur unter anaeroben Bedingungen ein Dimer (4Fe-FNR) bilden und so an die DNA binden (LAZAZZERA et al., 1996; GREEN et al., 1996). Jedoch ließen sich für die FpoO Untereinheit, auch unter anaeroben Bedingungen, keine DNA-Bindung an die untersuchten DNA-Bereiche beobachten. Es ist somit zu vermuten, dass die Funktion der O-Untereinheit eher im Bereich der Elektronenübertragung auf das Methanophenazin zu suchen ist oder aber an der Regulation anderer Gene beteiligt ist.

```

      ↗ fpo promo fw1
ttgcagaactagctagctaccttaaatcttaattattaattatatt
actttcacgcgaatgagtgcaaaaccatcggaaggatggagttctcc
tgactttcggaatttatcatataatcctgggcatcgaaaagtaaa
tttttcaaggcctgggagtcaggatgtccatattcaagagccatct
      ↗ fpo promo fw2
tcagtaaaaaggcacctgggtacagacattctctaccgggcctgta
ccgggtcaaatggtttgtaaataaccggaagattcggacagtctttt
tgtccagcatcttaaaaattaaaaattaaaatcatgcaacgctgca
      ...SD...
atttcagattgctgcactttgatagggtgatacaatgctctggaataa
      ↗ Start fpoA
      fpo promo rev
      ↖
ttgatagctatataccggttgccatatttcttgcgct

```

Abb. 57: Promotorbereich des *fpo* Operons aus *Ms. mazei*

grauunterlegt sind die Oligonukleotide zur Amplifikation der DNA-Fragmente;
mit SD ist die Konsensussequenz der Ribosomenbindestelle gekennzeichnet;
unterstrichen ist der Startpunkt der Translation

```

ttaaagaccttgaagcaatcgagtaaccagattggtgccggatc
      ↗ fpof promo fw
ccctatcggtcctgacaaagaaaaggcaataaagcttataggcaa
gagatcattgcaaagatgtaattttattacatcctgcaataatttt
ttttaatttatctcattataacttttaaaaacatcttgccagtaagg
      ..SD..
caagcttatcaaggcagtgaggtaactgatttgccaccaagattg
      ↗ Start fpoF
      ↖ fpof promo rev
      ↖
cagaag

```

Abb. 58: Promotorbereich des *fpoF* Gens aus *Ms. mazei*

grauunterlegt sind die Oligonukleotide zur Amplifikation der DNA-Fragmente, mit
SD ist die Konsensussequenz der Ribosomenbindestelle gekennzeichnet,
unterstrichen ist der Startpunkt der Translation

3.4 Kristallisation der Inputmodule der $F_{420}H_2$ Dehydrogenasen aus *A. fulgidus* und *Ms. acetivorans*

Wie anfangs schon erwähnt, weisen die Untereinheiten der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen aus *A. fulgidus* und *Methanosarcina* Spezies hohe Homologien zu den Untereinheiten der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase aus Bakterien, sowie zu dem Kernenzym des Komplex I der Mitochondrien auf (WEIDNER et al., 1993; YAGI, 1993). Lediglich die sogenannten Inputmodule, die F-Untereinheiten, welche zur Oxidation des $F_{420}H_2$ dienen, haben im Komplex I kein entsprechendes Homolog. Im Fall von *Methanosarcina* Spezies tritt eine weitere Untereinheit, das FpoO Protein auf, welches ebenfalls kein entsprechendes Pendant im Komplex I findet. Die O-Untereinheit der methanogenen Organismen könnte an der Reduktion des membranintegralen Elektronenüberträgers, des Methanophenazins, beteiligt sein. Die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase aus *Ms. mazei* weist außerdem eine geringere Kopplungseffizienz als der Komplex I auf. So konnte an gewaschenen invertierten Vesikeln von *Ms. mazei* festgestellt werden, dass bei einem Elektronentransfer von $F_{420}H_2$ auf den löslichen Elektronenakzeptor 2-OH-Phenazin, pro zwei transferierten Elektronen zwei Protonen transloziert werden (BÄUMER et al., 2000). Der Komplex I hingegen transportiert mindestens vier Protonen (GALKIN et al., 1999) pro Reaktionszyklus über die Membran, und trägt damit entscheidend zur Aufrechterhaltung des für die ATP Synthese nutzbaren Membranpotentials bei (siehe Abb. 65). Dieser Unterschied könnte neben der Nutzung anderer Elektronenakzeptoren auch in strukturellen Unterschieden begründet sein. Der Komplex I ist zur Zeit der letzte Komplex der Atmungskette von dem bisher noch keine dreidimensionale Struktur vorliegt. So konnte die 3D-Struktur des Komplex IV, der Cytochrom-*c*-Oxidase (MICHEL et al. 1998) und des Komplex III, der Chinon-Oxidoreduktase/*bc*₁-Komplex (XIA et al., 1997; CROFTS und BERRY, 1998), entscheidende Hinweise auf die Funktion dieser protonentranslozierenden Komplexe geben. Vom sogenannten Komplex II der Atmungskette, der Succinat-Dehydrogenase, liegt noch keine 3D-Struktur vor, jedoch konnte die Struktur der bakteriellen Fumarat-Dehydrogenase, die als Pendant zum Komplex II angesehen wird, gelöst werden (IVERSON et al. 1999; LANCASTER et al. 1999). Da momentan trotz intensiver Forschung noch keine 3D-Struktur des Komplex I oder Komplex I-ähnlicher Enzyme vorliegt, wird zur Zeit heftig diskutiert, wie der Transfer der Elektronen durch den Komplex mit der Protonentranslokation gekoppelt ist. Bis zur Auflösung der 3D-Struktur kann über den Mechanismus der Protonentranslokation jedoch nur spekuliert werden. Der Komplex I spielt eine große Rolle bei der Generierung

reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROBINSON, 1998). Auch werden Defekte des Komplex I vermehrt mit schweren Krankheiten des Menschen in Verbindung gebracht (TRIPELS et al., 2001, siehe Kapitel 4.7). Daher ist es von großem Interesse die Struktur des Komplex I zu lösen, um so die Funktion des initialen Komplex I der Atmungskette besser zu verstehen. Das Hauptproblem bei der Lösung der Struktur des Komplex I, ist seine enorme Größe. So ist der mitochondriale Komplex, mit einer molekularen Masse von fast 1000 kDa, bestehend aus bis zu 45 verschiedenen Untereinheiten, der weitaus größte Bestandteil der Atmungskette. Auch die als Minimal-Komplex I angesehene NADH-Dehydrogenase der Prokaryonten besteht aus bis zu 14 Untereinheiten und weist eine Gesamtgröße von etwa 500 kDa auf. Hinzu kommt das Problem der Aufreinigung. Bisher konnte der prokaryotische Komplex nur aus *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Aquifex aeolicus* in seiner vollständigen und intakten Form aufgereinigt werden (LEIF et al., 1995; KREBS et al., 1999; PENG et al., 2003). Zur Auflösung der Struktur der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen aus *A. fulgidus* und *Methanosarcina spec.* sollten daher einzelne Untereinheiten und Subkomplexe heterolog in *E. coli* überproduziert werden, um dann mit den aufgereinigten Proteinen Kristallisations-experimente durchführen zu können. Die 3D-Struktur der Inputmodule der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen, könnte wertvolle Informationen über die Aufnahme der Elektronen in den Komplex liefern. Ein Vorteil bei der Kristallisation des $F_{420}H_2$ -abhängigen Inputmoduls könnte sein, dass es im Gegensatz zu dem Inputmodul der NADH-Dehydrogenase nicht aus drei Untereinheiten aufgebaut ist, sondern lediglich aus einer Untereinheit besteht. Trotz der Verwendung unterschiedlicher Elektronendonatoren kann die Struktur der F-Untereinheit der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase wertvolle Hinweise auf die Funktion des Komplex I der Atmungskette geben. Außerdem zeigen die F-Untereinheiten Homologien zu der FrhB-Untereinheit der F_{420} -abhängigen Hydrogenase aus methanogenen Archaea (SORGENFREI et al., 1997). Hier kann die Struktur der F-Untereinheit der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen, als eine Art Leit-Struktur, zum Verständnis der Funktion dieser Hydrogenasen beitragen.

Voraussetzung für die Auflösung der 3D-Struktur eines Proteins ist das Vorhandensein eines Kristalls mit periodisch geordneter dreidimensionaler Struktur. Bei der Proteinkristallisation sieht man sich mit mehreren Problemen konfrontiert. Voraussetzung für die erfolgreiche Kristallisation von biologischen Makromolekülen ist zunächst eine homogene Proteinlösung. Ein weiteres Problem stellt die Überwindung der sogenannten Keimbildungsbarriere dar. Allgemein können sich Kristallisationskeime nur in übersättigten Lösungen bilden. Dieser Bereich ist jedoch für das Wachstum des Kristalls sehr ungünstig, da hier bevorzugt viele

kleine Kristalle entstehen. Für die Züchtung von großen Kristallen sollte die Lösung möglichst nicht übersättigt sein. Jedoch werden in diesem Bereich keine Kristallisationskeime gebildet. Zur Überwindung dieses Problems wurde die sogenannte Dampf-Diffusionsmethode entwickelt. Hierbei wird die Proteinlösung mit einer Mutterlösung, bestehend aus einem Präzipitations-Agens und diversen anderen Zusätzen, meist im Verhältnis 1:1 gemischt und in einem abgeschlossenen Raum einem sehr viel größeren Reservoir derselben Mutterlösung gegenübergestellt. Aufgrund der geringeren Fällungsmittelkonzentration im Proteintropfen tritt ein Transport von Wassermolekülen in Richtung Reservoir ein. Die Fällungsmittelkonzentration im Tropfen nimmt zu und irgendwann wird die Keimbildungsbarriere überschritten. Es kommt nun zur Bildung von Kristallisationskeimen. Als Konsequenz daraus verringert sich die Proteinkonzentration im Tropfen und im Idealfall nähert sie sich einem Bereich, in dem keine neuen Kristalle mehr entstehen, jedoch die vorhandenen Kristallisationskeime langsam weiterwachsen können. Es entstehen wenige, dafür aber große Kristalle. Für die Kristallisationsexperimente der F-Untereinheiten wurde diese Dampf (Vapor)-Diffusions-Methode mit „sitting drops“ angewandt.

Für die Züchtung von Protein-Kristallen, muß die Proteinlösung in den Bereich der Übersättigung gebracht werden, hierbei spielen nach MC PHERSON (1982/1990) verschiedene Parameter eine Rolle: Zum einen wären die verwendeten Präzipitations-Agenzien zu nennen. Diese kann man in drei Kategorien einteilen: 1. Salze, wie etwa Ammoniumsulfat, 2. organische Lösungsmittel wie Ethanol, Isopropanol oder 2-Methyl-2,4-Pentandiol (MPD) und 3. Polyethylen Glykole (PEG) mit verschiedenen molekularen Massen. Auch die Temperatur kann sich stark auf das Kristallisationsverhalten der Proteine auswirken. Die Kristallisations-Temperaturen befinden sich meist im Bereich von 0 bis 40°C, wobei Temperaturen von 4°C und 20° bevorzugt werden. Die Proteinkonzentration ist ebenfalls ein wichtiger Faktor. Generell lässt sich hier sagen, dass die Proteinkonzentration so hoch wie möglich sein sollte; meist liegt sie jedoch zwischen 5 und 30 mg/ml. Der pH-Wert gilt neben den Fällungsmitteln als die wichtigste Variable bei der Suche nach optimalen Kristallisationsbedingungen. Schon minimale Änderungen des pH-Wertes können darüber entscheiden, ob das Protein als amorphes Präzipitat, als Mikro-Kristall oder als großer Einzel-Kristall vorliegt. Zu Beginn der Kristallisationsexperimente sollte daher das Präzipitationsverhalten des Proteins bei verschiedenen pH-Werten in Kombination mit verschiedenen Salzkonzentrationen ermittelt werden. Reduzierende Agenzien wie β -Mercaptoethanol, Glutathion oder 1,4-Dithio-L-threitol (DTT), kommen bei der

Kristallisation zur Verhinderung der Oxidation der Cystein-Reste und dem daraus resultierenden Verlust der strukturellen Integrität der Proteine zum Einsatz. Eisen-Schwefel-Proteine wie etwa die sogenannten HIPIPs (High-Potential-Iron-Sulfur-Proteins) aus *Chromatium vinosum* (KRAUT und STRAKS, 1968) wurden unter hundertfachen Überschuss an reduzierendem Agens kristallisiert. Auch kann die Art der Präparation und die Reinheit des Proteins Einfluss auf sein Kristallisationsverhalten haben. So ist, bis auf wenige Ausnahmen, ein homogen vorliegendes Protein besser zur Anzucht großer Einzel-Kristalle geeignet als eine durch kontaminierende Proteine verunreinigte Präparation. Auch im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der Kristallisationsexperimente sollten diese mit einem homogenen Protein durchgeführt werden. Substrate und Coenzyme führen durch Bindung an das Protein zu Konformationsänderungen und können so ebenfalls auf das Kristallisationsverhalten einwirken. Zumeist bewirkt die Bindung des Substrats eine kompaktere und stabilere Form des Proteins, die einer Kristallisation nicht gut zugänglich ist. Jedoch ist die Verwendung eines Substrats im Kristallisationsansatz eine Möglichkeit die Kristallisation des Proteins zu beeinflussen. Dies ist besonders dann ratsam, wenn die Apo-Form des Enzyms der Kristallisation nicht oder nur schwer zugänglich ist. Die Zeit, die notwendig ist um einen großen Einzel-Kristall anzuziehen, kann zwischen wenigen Stunden und einigen Monaten variieren. Dabei kann es schon nach einigen Stunden zu Kristallisationskeimen kommen, jedoch erreichen die Kristalle meist erst nach einigen Wochen oder gar Monaten ihre volle Größe.

Da die Suche nach den optimalen Kristallisationsbedingungen aufgrund der vielen, die Kristallisation beeinflussenden Parametern, ein schwieriges und zeitaufwendiges Verfahren sein kann, bedient man sich kommerziell erhältlicher Kristallisations-Screens. Diese ermöglichen es, das Verhalten des Proteins unter vielen verschiedenen Bedingungen zu testen. Bei den Kristallisationsexperimenten mit dem FqoF und dem FpoF Protein wurden die Hampton Crystal-Screens I und II, der sogenannte PEG-Ion-Screen und zahlreiche selbst angesetzte Kristallisationslösungen (siehe 2.17), wie Screens mit verschiedenen PEG's und Screens mit Ammoniumsulfat oder NaCl bei verschiedenen pH-Werten verwendet.

Die Kristallisationsexperimente wurden im Labor von Prof. Dr. Ralph Ficner (Molekulare Strukturbiologie; Institut für Mikrobiologie und Genetik, Göttingen) durchgeführt. Sobald ein erfolgsversprechender Kristall vorlag, sollten die anschließenden Röntgenstrukturanalysen von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Ralph Ficner durchgeführt werden.

3.4.1 Kristallisation des FqoF Proteins

Zum Einsatz kam hier das FqoF Protein (30 mg/ml), welches über eine Hitzebehandlung aufgereinigt wurde (siehe 3.2.1.2) sowie das Strep-Tag-Fusions-protein (15 mg/ml; siehe 3.2.1.3). Nach der Durchführung der sogenannten initialen Screens mit Ammoniumsulfat, NaCl, Polyethylen Glykol (PEG), 2-Methyl-2,4-Pentandiol (MPD) über einen pH-Bereich von pH 4 bis pH 10, sowie der Hampton-Screens I/II und des PEG/Ion-Screens kann über das Kristallisationsverhalten des FqoF Proteins folgende Aussage getroffen werden: Als geeignete Präzipitations-Agenzien erwiesen sich Polyethylen Glykol (PEG 3350, PEG 4000 und PEG 5000), 2-Methyl-2,4-Pentandiol (70 % MPD) und Salze der ersten Hauptgruppe (0,2 M K_2SO_4 , 0,2 M RbCl). Die besten Ergebnisse lieferte eine Kristallisations-Temperatur von 20 °C und eine Proteinkonzentration von 30 mg/ml. Der optimale pH-Wert lag im neutralen bis schwach basischen Bereich. Bei einem pH-Wert unter 6 und oberhalb von 8,5 lag das Protein meist als amorphes Präzipitat vor. Die Zugabe von reduzierenden Agenzien beeinflusste die Kristallisation nicht entscheidend. Auch die Zugabe anderer Effektoren, wie das Detergenz β -Octylglucosid oder von Glycerin zeigte keinen durchgreifenden Erfolg. Die Verwendung des F_{420} (20 μ M) als Substrat erbrachte ebenfalls keinen nennenswerten Effekt. Abbildung 59 zeigt Kristallisationsversuche mit dem PEG/Ion-Screen (Pufferbedingung 34; 20 % PEG 3350; 0,2 M K_2SO_4 ; 0,1 M HEPES; pH 7), die mit dem FqoF Protein ohne Tag durchgeführt wurden.



Abb. 59: Kristallisationsversuche mit dem FqoF Protein
20%PEG 3350; 0,2M K_2SO_4 ; 0,1M HEPES; pH 7

Hier kam es schon nach 24 h zu einer deutlichen Phasentrennung zwischen dem Protein und dem Puffer. Jedoch handelte es sich nicht um Kristallstrukturen. Das Protein agglomerierte vielmehr, ohne jedoch auszufallen. Innerhalb dieser braunefärbten Agglomerate könnte es zu einer Übersättigung des Proteins gekommen sein, wie es für das Entstehen von Kristallisations-Keimen notwendig ist. Aufgrund der deutlichen Braunfärbung ist weiterhin zu vermuten, dass auch die prosthetischen Gruppen, die Eisen-Schwefel-Zentren und das FAD noch vorhanden waren und somit die Untereinheit in der nativen Form vorlag. Die Puffer-Bedingung 34 (20% PEG 3350; 0,2 M K_2O_4S ; 0,1 M HEPES; pH 7) wurde nun sukzessive verändert, um eine Bedingung zu finden, die geeigneter für das Entstehen von Kristallisations-Keimen geeignet war. Es kamen verschiedene Additive wie das Detergenz β -Octylglucosid, Isopropanol, Glycerin und als Reduktionsmittel DTT zum Einsatz. Auch wurden verschiedene Kaliumsalze und Sulfate, sowie PEG's mit verschiedenen Molekularmassen für die Kristallisationsexperimente verwendet (siehe 2.17). Zusätzlich wurden sogenannte Co-Kristallisationsexperimente des FqoF Proteins mit seinem Substrat, dem F_{420} , durchgeführt. In Abbildung 60 sieht man einen Kristallisationsversuch mit Rubidium-Chlorid und DTT (20 % PEG 3350; 0,2 M RbCl; 4 mM DTT; 0,1 M HEPES; pH 7). Das Ergebnis ähnelt dem in Abbildung 59, auch hier erschien die Protein-Phase deutlich braun gefärbt. Für das FqoF-Fusionsprotein mit dem Strep-Tag konnten ebenfalls ähnliche Ergebnisse unter diesen Bedingungen erzielt werden (nicht gezeigt). Als Fazit bleibt zu vermerken, dass die vielen verschiedenen Ansätze nicht zur Bildung von geeigneten Kristallstrukturen führten.

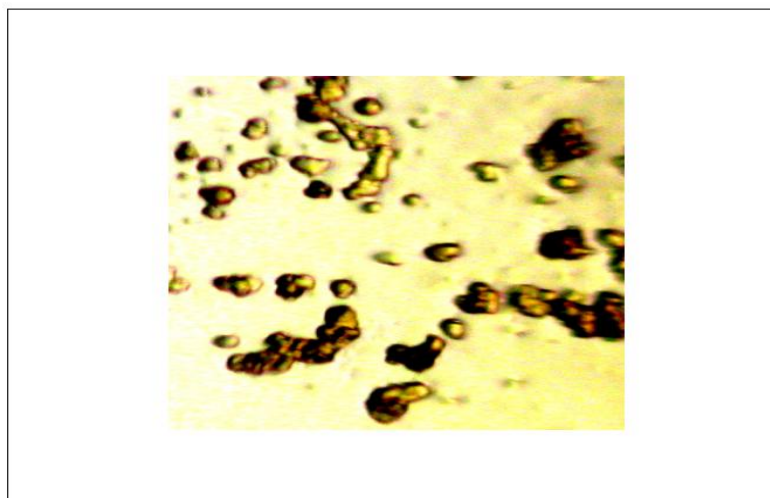


Abb. 60: Kristallisationsversuche mit dem FqoF Protein
20 % PEG 3350; 0,2 M RbCl; 4 mM DTT; 0,1 M HEPES; pH 7

Erst nach 5 Monaten kam es unter der Pufferbedingung 35 (70 % MPD, 0,1 M HEPES, pH 7,5) des Hampton-Screen II bei 20 °C zum Wachstum von Kristallen (s. Abb. 61). Die bräunliche Färbung der Kristalle wies auf das Vorhandensein der prosthetischen Gruppen hin. Es ist somit zu vermuten, dass die Eisen-Schwefel-Zentren und das FAD in ihrer nativen Form im Protein vorlagen. Die Kristalle lagen jedoch nicht als Einzel-Kristalle vor, vielmehr erinnerte die Struktur an einen Nadel-Cluster mit Ausstülpungen an den Enden. Diese Ausstülpungen waren jedoch gleichmäßig geformt und bildeten zumeist oktaedrische Formen aus, so dass Vorversuche zur Strukturanalyse durchgeführt werden konnten (siehe 3.5).

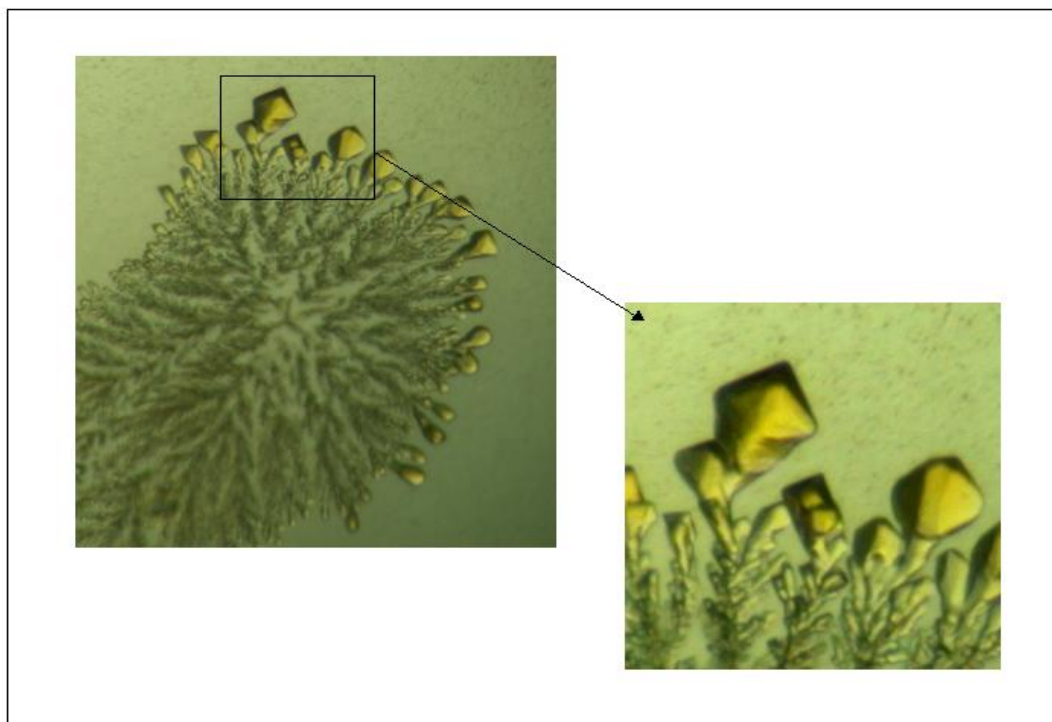


Abb. 61: Kristalle des FqoF Proteins im Hampton Screen II
70 % MPD, 0,1 M HEPES, pH 7,5

2.4.2 Kristallisation des FpoF Proteins

Auch mit dem aufgereinigten FpoF Protein (siehe 3.2.2) aus *Ms. acetivorans* wurden zahlreiche Kristallisations-Screens durchgeführt. Das Kristallisationsverhalten dieser Untereinheit der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase war dem des FqoF Proteins recht ähnlich. Als geeignete Präzipitations-Agenzien erwiesen sich Polyethylen Glykol (PEG 3350, PEG 4000 und PEG 5000) und Salze der ersten Hauptgruppe sowie Zinkacetat. Im Gegensatz zum FqoF

Protein eignete sich MPD nicht als Fällungsmittel. Die besten Ergebnisse lieferte ebenfalls eine Kristallisations-Temperatur von 20 °C, jedoch lag die optimale Proteinkonzentration zwischen 10 und 15 mg/ml. Der optimale pH Wert lag wiederum im neutralen bis schwach basischen Bereich. Wie bei dem Protein aus *A. fulgidus* lag das FpoF Protein bei einem pH-Wert unter 6 und oberhalb von 8,5 meist als amorphes Präzipitat vor. Auch die Zugabe von Additiven, reduzierenden Agenzien und Substrat zeigte keinen nennenswerten Einfluss.

Zum Wachstum eines Kristalls kam es jedoch auch bei den Kristallisationsexperimenten mit dem FpoF Protein. Im PEG/Ion-Screen bei 20 °C konnte nach 7 Monaten unter der Bedingung 26 (20 % PEG 3350, 0,2 M Zinkacetat, pH 7,5) das Wachstum eines Kristalls beobachtet werden. Die Proteinkonzentration betrug 12 mg/ml. In Abbildung 62 erkennt man die braun gefärbten, nadelförmigen Kristalle des FpoF Proteins. Auch die Kristalle des FpoF Proteins lagen nicht als Einzel-Kristalle vor.

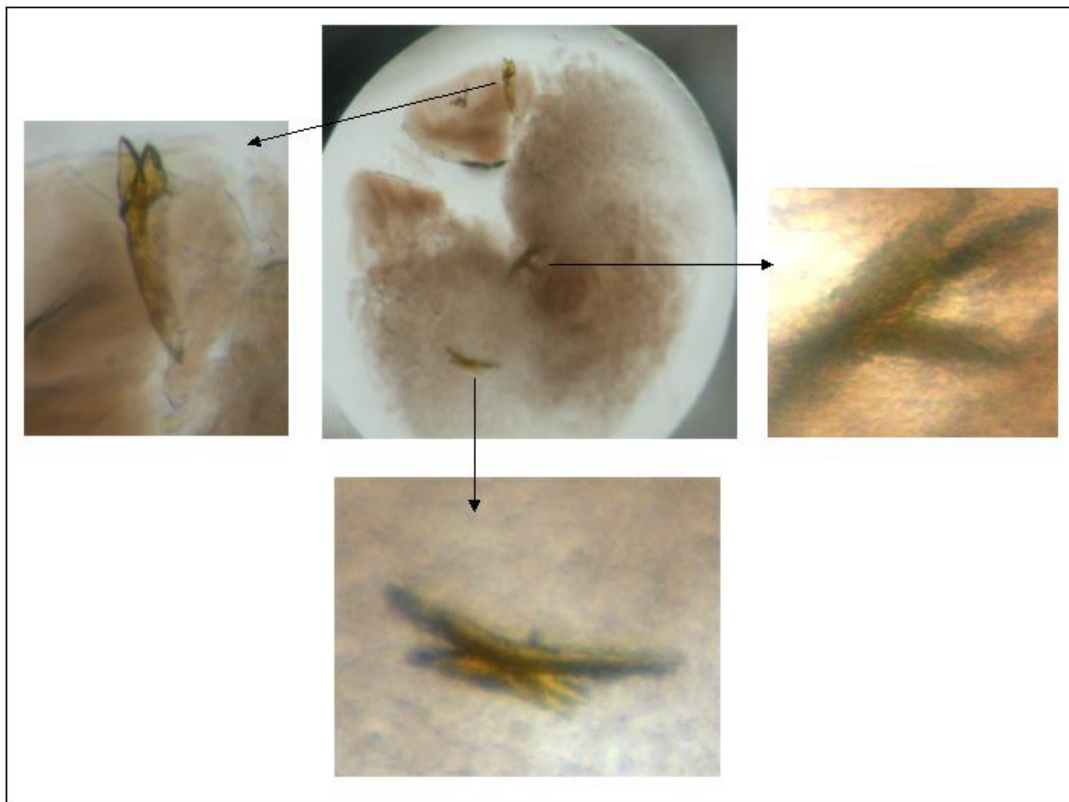


Abb. 62: Kristalle des FpoF Proteins
20% PEG 3350, 0,2 M Zinkacetat, pH 7,5 (FpoF 12mg/ml)

Aus diesen Experimenten ging hervor, dass es möglich ist, die F-Untereinheit der F₄₂₀-Dehydrogenase aus *A. fulgidus* und *Ms. acetivorans* zu kristallisieren. Weitergehende Kristallisationsexperimente müssen zum Ziel haben, die Kristallisationszeit zu verringern, um so ein „Austrocknen“ des Pufferreservoirs zu verhindern und um so wohlgeordnete Einzel-Kristalle zu erhalten.

3.4.3 Kristallisation des FpoO Proteins

Da auch das FpoO Protein in guten Ausbeuten heterolog produziert werden kann, sind mit dieser Untereinheit der F₄₂₀H₂ Dehydrogenase aus *Ms. mazei* Kristallisationsexperimente geplant. Hierzu ist es notwendig, die Experimente unter anaeroben Bedingungen durchzuführen, da sich das Eisen-Schwefel-Zentrum als sauerstofflabil erwies. Die für diese Experimente notwendigen anaeroben Kristallisationskammern waren zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten im Institut für Molekulare Strukturbiologie, Göttingen, noch nicht verfügbar. Sobald jedoch die Anaerobenkammern eingerichtet sind, kann auch mit der Kristallisation des FpoO Proteins begonnen werden.

3.5 Röntgenstrukturanalyse der Kristalle des FqoF und des FpoF Proteins

Die erhaltenen Kristalle der F-Untereinheiten der F₄₂₀H₂-Dehydrogenasen aus *A. fulgidus* und *Ms. acetivorans* (siehe Abb. 61 und Abb. 62) wurden von Frau Dr. Susana Andrade (Molekulare Strukturbiologie; Institut für Mikrobiologie und Genetik, Göttingen) auf ihre Fähigkeit getestet, Röntgenstrahlen zu beugen. Es stellte sich jedoch leider heraus, dass die erhaltenen Kristalle im Röntgenstrahl nicht streuten. Es werden weitere Kristallisationsexperimente nötig sein, um Kristalle zu erhalten, welche die notwendige Streuung im Röntgenstrahl aufweisen.

4. Diskussion

4.1 Bedeutung der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase im archaeellen Stoffwechsel

In der vorliegenden Arbeit wurde die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase der methanogenen Archaeen *Ms. mazei* Gö1 und *Ms. acetivorans* sowie des sulfatreduzierenden Archaeons *A. fulgidus* untersucht. Die meisten Vertreter der Gattung *Methanosarcina* sind in der Lage, H_2/CO_2 , Methanol, Methylamine und Acetat zu Methan und CO_2 umzusetzen. Sie stehen somit am Ende der anaeroben Nahrungskette (CONRAD, 1999), da sie die erwähnten Substrate, die durch gärende und syntrophe Bakterien gebildet werden, zu CH_4 und CO_2 umsetzen und so den gebundenen Kohlenstoff wieder dem globalen C-Kreislauf in gasförmigem Zustand zuführen. Der Abbau organischen Materials unter anaeroben Bedingungen stellt einen der bedeutendsten biologischen Prozesse dar (ZINDER, 1993). Der Prozess der Methanbildung, die sogenannte Methanogenese, wurde nicht zuletzt aus diesem Grunde intensiv erforscht (FERRY, 1992; THAUER et al., 1993; BLAUT, 1994; DEPPENMEIER et al., 1996; THAUER, 1998; DEPPENMEIER, 2002a). *A. fulgidus*, dessen $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase in dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurde, ist hingegen ein hyperthermophiles Archaeon, das anaerob wächst. Sein Habitat sind marine hydrothermale Areale (STETTER, 1988; ZELLNER et al., 1989; BEEDER et al., 1994). Dort kann der hyperthermophile Organismus sowohl organoheterotroph mit verschiedenen Kohlenstoff- und Energiequellen (z.B. Laktat, Pyruvat, 2,3-Butandiol) als auch lithoautotroph mit H_2 , SO_4 und CO_2 wachsen (STETTER, 1988; VORHOLT et al., 1995).

Die in dieser Arbeit untersuchten $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen sind Bestandteil der energiekonservierenden Systeme und erfüllen eine zentrale Aufgabe im Energie-Stoffwechsel dieser Organismen. Im Folgenden soll daher zunächst auf den Stoffwechsel und auf den Mechanismus der Energiekonservierung dieser Organismen eingegangen werden.

4.1.1 Energiekonservierung von *A. fulgidus* bei Wachstum auf Laktat und Sulfat

Der in der vorliegenden Arbeit analysierte Organismus *A. fulgidus* zählt, ebenso wie *Methanosarcina*, zu der Gruppe der *Euryarchaeota* (WOESE et al., 1990, 1991). Der Organismus ist strikt anaerob und zeigt ein optimales Wachstum bei 83 °C. Er ist in der Lage Laktat und Sulfat als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Dabei wird Sulfat zu H₂S reduziert und die organischen Substrate zu CO₂ oxidiert (Abb. 63). Diese Redoxreaktion läßt sich wie folgt zusammenfassen (ACHENBACH-RICHTER et al., 1987; STETTER et al., 1987; STETTER, 1988):

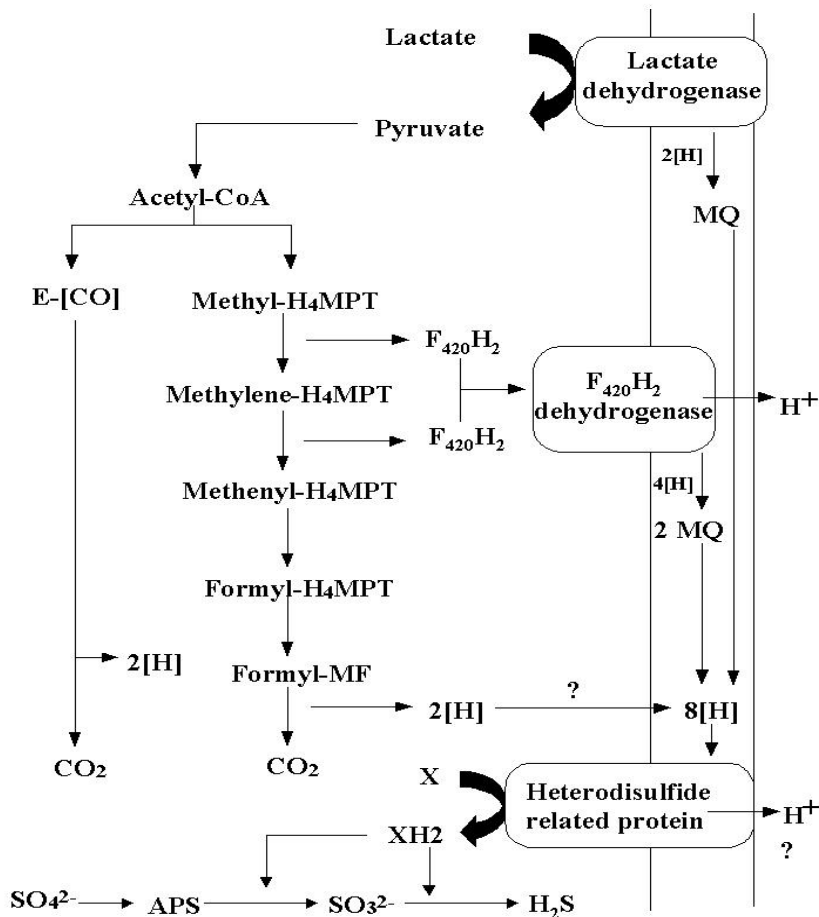
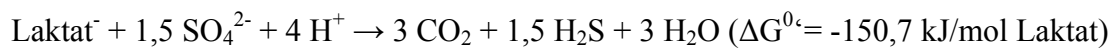


Abb.63: Modell für den Stoffwechsel in *A. fulgidus* beim Wachstum auf Laktat und Sulfat (aus: SCHMIDT, 2002, nach MANDER et al., 2002)

Im ersten Schritt wird das Laktat zu Pyruvat oxidiert (REED und HARTZELL, 1999) und die anfallenden Reduktionsäquivalente werden auf ein für *A. fulgidus* typisches Menachinon übertragen (Abb. 63). Dieses Menachinon wurde aus *A. fulgidus* isoliert und besitzt eine vollständig gesättigte Seitenkette aus sieben Isopren-Einheiten (TINDALL et al., 1989). Es schließt sich eine oxidative Decarboxylierung des Pyruvats zu Acetyl-CoA unter Reduktion von Ferredoxin an. Diese Reaktion wird von der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase katalysiert (MÖLLER-ZINKHAHN et al., 1989; MÖLLER-ZINKHAHN und THAUER 1990; SCHMITZ et al., 1991). Die Umsetzung von Acetyl-CoA erfolgt durch den Acetyl-CoA-Synthetase/CO-Dehydrogenase-Komplex (kurz CO-DH; DAI et al., 1998), wobei die Methylgruppe auf Tetrahydromethanopterin (H₄MPT) übertragen wird und die Carbonylgruppe am Enzym gebunden bleibt, bevor sie zu CO₂ oxidiert wird (Abb. 63). Das Methyl- H₄MPT wird in einem zweistufigen Schritt zu Methenyl-H₄MPT oxidiert. Die dabei anfallenden Reduktionsäquivalente werden auf F₄₂₀ übertragen. Der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase kommt nun die Aufgabe der Regeneration des reduzierten F₄₂₀H₂ zu. Das Protein überträgt die Reduktionsäquivalente auf das als membranintegroaler Elektronenakzeptor fungierende Menachinon. Die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase katalysiert diese Reaktion vermutlich unter Aufbau eines Protonengradienten, welcher wiederum zur ATP-Synthese genutzt werden kann. Damit stellt die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase ein zentrales Enzym bei der Energiekonservierung im Stoffwechsel des Organismus dar. Methenyl-H₄MPT wird nachfolgend zu Formyl-H₄MPT dehydratisiert und die Formyl-Gruppe schließlich auf Methanofuran (MFR) übertragen (Abb. 63). Formyl-MFR wird dann von der Formyl-MFR-Dehydrogenase zu CO₂ oxidiert und die Reduktionsäquivalente auf einen unbekanntenen Elektronenakzeptor übertragen. Der beschriebene Stoffwechselweg der Methylgruppen-Oxidation ähnelt dem oxidativen Zweig der Methanogenese (siehe 4.1.2.1).

Aus der Genomsequenz von *A. fulgidus* ist ersichtlich, dass dieser Organismus nicht über Gene verfügt, die für Proteine zur Coenzym M-Synthese und Coenzym F₄₃₀ abhängige Enzyme kodieren. So besitzt *A. fulgidus* keine Methyl-Coenzym M Reduktase, infolgedessen ist er auch nicht zur Methanbildung befähigt. Vielmehr nutzt *A. fulgidus* Sulfat als terminalen Elektronenakzeptor für die in den Menachinon-Pool übertragenen Reduktionsäquivalente. Das Sulfat wird von der ATP-Sulfurylase (DAHL et al., 1990; SPERLING et al., 2001) unter ATP-Verbrauch zu Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) aktiviert, welches wiederum von einer APS-Reduktase und einer Sulfit-Reduktase zu H₂S reduziert wird (Abb. 63).

Es ist bisher ungeklärt, wie der Organismus den reduzierten Menachinon-Pool mit der Sulfatreduktion verbindet. Jedoch wurde kürzlich ein membrangebundener

Multienzymkomplex (Hme-Komplex) aufgereinigt und charakterisiert, welcher Homologien zur Heterodisulfid-Reduktase von methanogenen Archaeen aufweist (MANDER et al., 2002). Nach dem von MANDER et al. (2002) vorgeschlagenen Modell besteht der Hme-Komplex aus fünf Untereinheiten, welche zusammen die Oxidation von Menachinol katalysieren und Elektronen auf einen bislang unbekanntem Akzeptor übertragen. Der unbekanntem Elektronenakzeptor könnte in seiner reduzierten Form als Elektronendonator für die Enzyme der Sulfatreduktion dienen. Das Modell gibt noch keinen Aufschluß über die Verbindung zwischen Menachinol-Pool und Sulfatreduktion, doch deutet alles auf eine komplexe, mehrstufige Reaktionskette, die von mehreren Enzymen abhängig ist.

4.1.2 Funktion der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase während der Methanogenese

Alle zur Methanogenese befähigten Organismen werden der Domäne der *Archaea* und innerhalb dieser Domäne dem Reich der *Euryarchaeota* zugeordnet. Im Hinblick auf ihre Substrat-Verwertung lassen sich zwei Gruppen methanogener Archaea unterscheiden (BOONE et al., 1993). Das Substrat-Spektrum der obligat hydrogenotrophen methanogenen Organismen ist auf H_2/CO_2 und Formiat beschränkt. Zu den Vertretern dieser Gruppe zählt man die Ordnung *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* und *Methanopyrales*. Die zweite Gruppe methanogener Organismen wird in der Ordnung *Methanosarcinales* zusammengefasst. Diese Arten sind in der Lage, einfache C_1 -Verbindungen, wie Methanol, Methylamine und Methylthiole sowie Acetat als Substrate zu verwerten. Zu dieser Gruppe zählen auch die in dieser Arbeit untersuchten *Methanosarcina* Stämme *Ms. mazei* Gö1 und *Ms. acetivorans*. Der erstgenannte Vertreter kann zudem auf H_2/CO_2 wachsen.

Im Zuge der Methanbildung kommt es zur Ausbildung eines elektrochemischen Ionen-Potentials über der Cytoplasmamembran, welches zur ATP-Synthese genutzt werden kann (MITCHELL, 1961). Dies wurde durch Untersuchungen an *Ms. barkeri* (BLAUT und GOTTSCHALK, 1984; BLAUT et al., 1987; MÜLLER et al., 1988) und an *Ms. mazei* Gö1 nachgewiesen (JUSSFIE et al., 1986; PEINEMANN et al., 1989; DEPPENMEIER et al., 1990/1991). Das entscheidende Enzym zur ATP-Bildung ist hierbei eine ATP-Synthase des A_1A_0 -Typs (MÜLLER et al., 1999).

An der Methanogenese sind eine Reihe von ungewöhnlichen Cofaktoren und prosthetischen Gruppen beteiligt. Hier sind die C_1 -Gruppen-Überträger Methanofuran (MFR), Tetrahydromethanopterin (H_4 MPT) und Coenzym M (2-Mercaptoethansulfonat; HS-CoM), sowie der Elektronenüberträger Coenzym B (7-Mercaptoheptanoylthreoninphosphat; HS-

CoB) zu nennen (DEPPENMEIER, 2002a). Der für diese Arbeit wichtigste Cofaktor ist jedoch der cytoplasmatische Elektronenüberträger der methanogenen Organismen, das F₄₂₀. Dieser Elektronenüberträger ist ein 5-Deazaflavin-Derivat und besitzt ein Standard-Redoxpotential (E₀') von -360 mV. In chemischer Hinsicht und in seinem Redoxpotential ähnelt das F₄₂₀ dem reversiblen Hydridionen-Überträger der Bakterien und Eukaryonten, dem NAD⁺ (E₀' = -320 mV). Ein weiterer redox-aktiver Faktor ist der membranintegrale Elektronenüberträger Methanophenazin, der aus der Cytoplasmamembran von *Ms. mazei* Göl isoliert werden konnte (ABKEN et al., 1999). Es ist das zur Zeit einzig bekannte Phenazinderivat, das als Elektronenüberträger in einer Atmungskette fungiert. Im Folgenden soll auf die Methanbildung unter Nutzung der verschiedenen Substrate eingegangen werden. In den letzten Jahren konnten die Stoffwechselwege der Methanogenese aufgeklärt werden (REEVE, 1992; FERRY, 1993; THAUER et al., 1993; BLAUT, 1994; DEPPENMEIER et al., 1996; THAUER, 1998; DEPPENMEIER, 2002a). Die Methanbildung aus den erwähnten Substraten läuft formal nach den in Tabelle 8 aufgeführten Formeln ab (BLAUT et al., 1992).

Tabelle 8: Substrate der Methanogenese

1.	$\text{CO}_2 + 4 \text{H}_2$	\rightarrow	$\text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	$(\Delta G^{0\prime} = -130 \text{ kJ/mol})$
2.	4HCOOH	\rightarrow	$3 \text{CO}_2 + \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	$(\Delta G^{0\prime} = -119 \text{ kJ/mol})$
3.	$4 \text{CH}_3\text{OH}$	\rightarrow	$3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	$(\Delta G^{0\prime} = -106 \text{ kJ/mol})$
4.	$(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+ + 6 \text{H}_2\text{O}$	\rightarrow	$9 \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 4\text{NH}_4^+$	$(\Delta G^{0\prime} = -76 \text{ kJ/mol})$
5.	$(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$	\rightarrow	$3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_4^+$	$(\Delta G^{0\prime} = -75 \text{ kJ/mol})$
6.	$4 \text{CH}_3 \text{NH}_3 + 2 \text{H}_2\text{O}$	\rightarrow	$3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_4^+$	$(\Delta G^{0\prime} = -77 \text{ kJ/mol})$
7.	$2 (\text{CH}_3)_2\text{S} + 2 \text{H}_2\text{O}$	\rightarrow	$3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{S}$	$(\Delta G^{0\prime} = -49 \text{ kJ/mol})$
8.	$\text{CH}_3\text{-COO}^- + \text{H}^+$	\rightarrow	$3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	$(\Delta G^{0\prime} = -36 \text{ kJ/mol})$

Je nach verwendetem Substrat werden die Methylgruppen auf drei verschiedenen Wegen auf das Coenzym M übertragen (siehe Abb. 64). Im Fall der Reduktion von Kohlendioxid wird CO₂ an MFR gebunden und zu Formyl-MFR reduziert. Diese endergone Reaktion ($\Delta G^{0\prime} = +16 \text{ kJ/mol}$; MÜLLER et al., 1993) wird von der Formyl-MFR-Dehydrogenase katalysiert und von einem Ionengradienten angetrieben (KAESLER und SCHÖNHEIT, 1989; BERTRAM und THAUER, 1994). Der direkte Elektronendonator der Formyl-MFR-Dehydrogenase ist höchst wahrscheinlich ein reduziertes Ferredoxin, welches von der H₂ oxidierenden Ech-Hydrogenase bereitgestellt werden kann (MEUER et al., 2002). In der

folgenden Reaktion wird die Formyl-Gruppe auf Tetrahydromethanopterin (H_4MPT) übertragen und das so entstandene Formyl- H_4MPT wird anschließend schrittweise zu Methyl- H_4MPT reduziert. Die für diese Reduktion benötigten Elektronen werden in Form von reduziertem F_{420} ($F_{420}H_2$) bereitgestellt, das wiederum von der F_{420} -reduzierenden Hydrogenase mit Hilfe von H_2 gebildet wird. Die Methyl-Gruppe des Methyl- H_4MPT wird dann auf das Coenzym M (HS-CoM) transferiert. Diese Reaktion ist exergon ($\Delta G^{\circ'} = -29$ kJ/mol) und mit dem Aufbau eines elektrochemischen Na^+ -Gradienten gekoppelt (MÜLLER et al., 1988; MÜLLER und GOTTSCHALK, 1992; LIENARD et al., 1996; GOTTSCHALK und THAUER, 2001). Dieser elektro-chemische Natriumgradient kann in *Ms. mazei* ebenfalls zur ATP-Synthese genutzt werden (BECHER und MÜLLER, 1994). In der letzten Reaktion des CO_2 -reduzierenden Stoffwechselweges reagiert das gebildete Methyl-HS-CoM mit Coenzym B (HS-CoB) unter Freisetzung von Methan und der Bildung eines Heterodisulfids (CoM-S-S-CoB). Diese Reaktion wird von der löslichen Methyl-Coenzym M-Reduktase katalysiert (THAUER, 1999).

Im methylotrophen Stoffwechselweg der Methanogenese dienen methylierte C_1 -Verbindungen als Substrat, die dann zu $CH_4 + CO_2$ disproportioniert werden (Abb. 64). Die Disproportionierung beginnt mit der Übertragung der Methylgruppen auf das Coenzym M. Dieser Schritt wird durch einen löslichen Methyltransferase-Enzymkomplex, bestehend aus den drei Polypeptiden, MtaA, MtaB und MtaC, (VAN DER MEIJDEN et al., 1983; HARMS und THAUER, 1996; SAUER und THAUER, 1999; DING et al., 2002; DEPPENMEIER, 2002a) katalysiert und leitet die Methanogenese aus methylierten C_1 -Verbindungen ein. An dieser Stelle verzweigt sich der Stoffwechselweg in den reduktiven und oxidativen Zweig. In Abwesenheit von H_2 gelangen pro mol Methyl-S-CoM 0,75 mol in den reduktiven Zweig, in dem Methyl-S-CoM mit Coenzym B unter Freisetzung von Methan zu einem Heterodisulfid (CoB-S-S-CoM) reagiert (BOBIK et al., 1987; ELLERMANN et al., 1988). Die Reaktion wird von der Methyl-CoM-Reduktase katalysiert (ERMLER et al., 1997). Die Heterodisulfid-Reduktase wiederum reduziert das Heterodisulfid zu Coenzym B und Coenzym M, welche dann wieder in den Reaktionszyklus eintreten können.

Im oxidativen Zweig werden die Methylgruppen der restlichen 0,25 mol Methyl-S-CoM mit Hilfe der Methyl- H_4MPT :CoM-Methyltransferase auf H_4MPT übertragen (Abb. 64). Diese Reaktion ist endergon ($\Delta G^{\circ'} = 29$ kJ/mol) und wird durch einen elektrochemischen Natriumionengradienten angetrieben (MÜLLER et al., 1988; MÜLLER und GOTTSCHALK, 1992; LIENARD et al., 1996; GOTTSCHALK und THAUER, 2001). Es folgt dann eine

zweistufige Oxidation des Methyl-H₄MPT zu Methenyl-H₄MPT (MA und THAUER, 1990; ENSSLE et al., 1991; TE BRÖMMELSTRÖT et al., 1991). Im weiteren Verlauf des oxidativen Zweigs der Methanogenese wird Methenyl-H₄MPT zu Formyl-H₄MPT dehydratisiert und die Formylgruppe auf Methanofuran (MF) übertragen (BREITUNG und THAUER, 1990). Formyl-MFR wird schließlich von der membrangebundenen Formyl-Methanofuran-Dehydrogenase zu CO₂ oxidiert (KARRASCH et al., 1989; VORHOLT et al., 1996). Die bei der zweistufigen Oxidation des Methyl-H₄MPT anfallenden Reduktionsäquivalente werden auf F₄₂₀ übertragen und dienen in Form von F₄₂₀H₂ als Elektronendonator für die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase (DEPPENMEIER et al., 1990; ABKEN et al., 1998; BÄUMER et al., 2000).

Der weitaus größte Teil des in der Natur produzierten Methans wird jedoch während der Methanogenese aus Acetat gebildet. Zur Nutzung von Acetat als Substrat sind nur die Gattungen *Methanosarcina* und *Methanosaeta* befähigt (FERRY, 1997). Nach der Aufnahme des Acetats in die Zelle muss es unter ATP-Verbrauch aktiviert werden (Abb. 64). Dies geschieht im Falle der *Methanosarcina* Stämme mit Hilfe einer Acetat-Kinase (LATIMER und FERRY, 1993; BUSS et al., 1997; BUSS et al., 2001) und einer Phosphotransacetylase (RASCHE et al., 1997), die den Acetyl-Rest auf CoA überträgt. Im Fall der *Methanosaeta* Spezies entsteht das Acetyl-CoA mittels einer Acetyl-CoA-Synthase. Das entstandene Acetyl-CoA wird im CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase-Komplex gespalten (ABBANAT und FERRY, 1991; RAYBUCK et al., 1991; MAUPIN-FURLOW und FERRY, 1996). Das enzymgebundene CO wird zu CO₂ oxidiert und die anfallenden Elektronen werden zur Reduktion von Ferredoxin verwendet (ABBANAT und FERRY, 1991). Zudem wird die Methylkomponente des Acetyl-CoA auf H₄MPT transferiert (FERRY, 1995; FERRY, 1997). Die nächsten Reaktionen erfolgen dann analog zur bereits geschilderten Umsetzung von Methyl-H₄MPT mittels der Natriumionen translozierenden Methyl-H₄MPT:HS-CoM Methyltransferase und der HS-CoB-abhängigen Methyl-CoM Reduktase (JABLONSKI und FERRY, 1991). Das entstehende CoM-S-S-CoB wird wiederum durch die Heterodisulfid-Reduktase reaktiv gespalten, wobei Reduktionsäquivalente in Form von reduziertem Ferredoxin aus der CO-Dehydrogenase-Reaktion bereitgestellt werden.

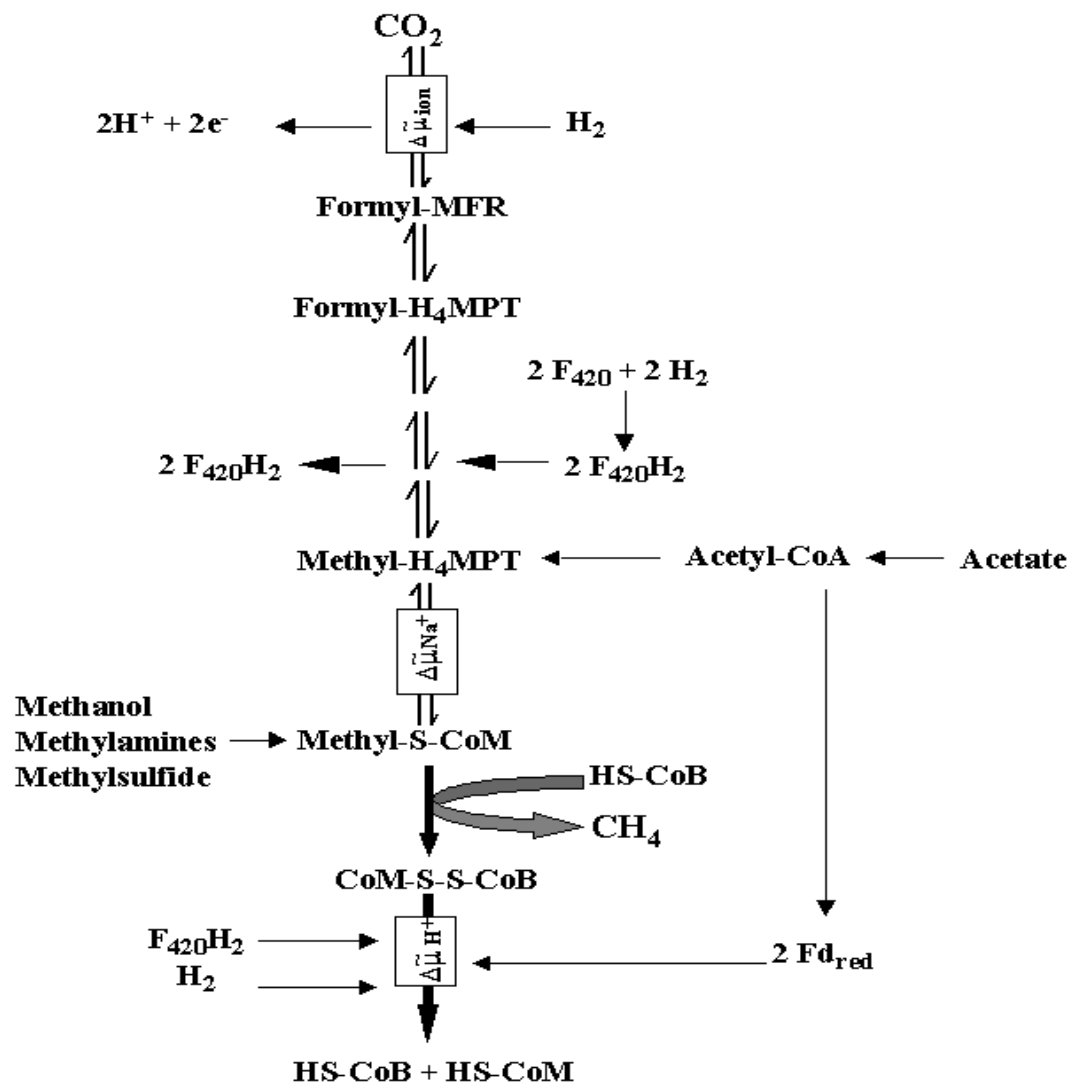


Abb. 64: Schematischer Überblick der methanogenen Stoffwechselwege

$\Delta\mu_{H^+}$ = elektrochemischer Protonengradient

$\Delta\mu_{Na^+}$ = elektrochemischer Natriumgradient

$\Delta\mu_{ion^+}$ = elektrochemischer Ionengradient

(aus DEPPENMEIER, 2002 b)

4.1.3 Protonentranslokation in methanogenen Archaea

Die $F_{420}H_2$ Dehydrogenase fungiert bei den in dieser Arbeit untersuchten methanogenen Organismen *Ms. mazei* Gö1 und *Ms. acetivorans* als initiale Komponente eines membrangebundenen Elektronentransportsystems. Im Zuge des Elektronentransports kommt es zu einer Protonentranslokation über die Cytoplasma-membran und zum Aufbau eines Protonengradienten, der zur ATP-Synthese genutzt werden kann (DEPPENMEIER et al., 1991; IDE et al., 1999; MÜLLER et al., 1999; BÄUMER et al., 2000; DEPPENMEIER 2002, a/b). Im Folgenden sollen nun die an der Protonentranslokation beteiligten Enzym-Systeme und deren Einzel-komponenten vorgestellt werden.

Wie schon im vorigen Kapitel erwähnt, kommt dem während der Methanogenese gebildeten Heterodisulfid (CoM-S-S-CoB) eine zentrale Rolle zu. Das Heterodisulfid dient in der methanogenen Atmungskette als terminaler Elektronenakzeptor. Die membrangebundene Heterodisulfid-Reduktase reduziert CoM-S-S-CoB und fungiert so als terminale Reduktase der membrangebundenen Elektronentransportketten in *Methanosarcina*-Arten. Die für die Reduktion des Heterodisulfids benötigten Reduktionsäquivalente werden in Abhängigkeit vom verwendeten Substrat auf drei verschiedenen Wegen erzeugt. In Anwesenheit von molekularem Wasserstoff transferiert eine membrangebundene Hydrogenase (F_{420} -nichtreduzierende Hydrogenase) Elektronen auf die Heterodisulfid-Reduktase, die dann den terminalen Elektronenakzeptor reduziert. Dieses Elektronentransportsystem wird als H_2 :Heterodisulfid-Oxidoreduktase bezeichnet (HEIDEN et al., 1993; SETZKE et al., 1994; DEPPENMEIER et al., 1991; DEPPENMEIER, 2002b). Nutzt *Methanosarcina* hingegen methylierte C_1 -Verbindungen als Substrat, wird ein Teil der Methyl-Gruppen zu CO_2 oxidiert und die Reduktionsäquivalente werden auf F_{420} übertragen. In diesem Fall ist das $F_{420}H_2$:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System für die Oxidation des $F_{420}H_2$ und die Reduktion des Heterodisulfids verantwortlich (DEPPENMEIER et al., 1990; DEPPENMEIER, 2002 b). Das dritte membran-gebundene Enzym-System, die Ferredoxin_{red}:Heterodisulfid-Oxidoreduktase, kommt im Acetat-Stoffwechsel der Methanogenese zum Einsatz. In diesem Fall erhält die Heterodisulfid-Reduktase die Elektronen zur Reduktion des Heterodisulfids von einem reduzierten Ferredoxin (Fd_{red}) (TERLESKY und FERRY, 1988; DEPPENMEIER et al., 1996; DEPPENMEIER, 2002 b). Für die beiden erst- genannten Systeme, das H_2 :Heterodisulfid-Oxidoreduktase und das $F_{420}H_2$: Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System konnte gezeigt werden, dass der Elektronen-transport mit einer Protonentranslokation über die Cytoplasmamembran gekoppelt ist (DEPPENMEIER et al., 1991; IDE et al., 1999) und das dieser elektrochemische Protonengradient für die ATP-Synthese mittels einer A_1A_0 ATP-

Synthese genutzt werden kann (MÜLLER et al., 1999). Pro reduziertem Heterodisulfid werden vier Protonen transloziert und ein ATP gebildet (DEPPENMEIER et al., 1990; DEPPENMEIER et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass an diesen zwei Systemen drei Enzyme beteiligt sind. In beiden Systemen dient die Heterodisulfid-Reduktase zur Reduktion des terminalen Elektronenakzeptors. Die hierzu notwendigen Reduktionsäquivalente erhält sie im Fall des H_2 :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systems von der membrangebundenen F_{420} -nichtreduzierenden Hydrogenase und im Fall des $F_{420}H_2$:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systems von der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase. Das letztgenannte Enzym stand in Mittelpunkt dieser Arbeit.

Nach der Entdeckung des neuartigen membranintegralen Elektronenüberträgers Methanophenazin konnte gezeigt werden, dass dieser als Elektronenakzeptor für die F_{420} -nichtreduzierende Hydrogenase und die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase fungiert. In der reduzierten Form dient Methanophenazin als Elektronendonator der Heterodisulfid-Reduktase (IDE et al., 1999; BÄUMER et al., 2000). Für die Elektronen-transportkette des $F_{420}H_2$:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systems ergibt sich danach folgendes Bild: In einer ersten Reaktion überträgt die in dieser Arbeit untersuchte $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase Elektronen von $F_{420}H_2$ auf Methanophenazin (ABKEN et al., 1998), wobei pro übertragenem Elektronenpaar zwei Protonen durch das Enzym zur Außenseite der Cytoplasmamembran transloziert werden (BÄUMER et al., 2000). Das reduzierte Methanophenazin wird dann in einer zweiten Reaktion von der Heterodisulfid-Reduktase reoxidiert und die Elektronen auf das Heterodisulfid übertragen, welches in CoM-SH und CoB-SH gespalten wird. Das Coenzym B steht somit wieder als Elektronendonator für den reduktiven Zweig zur Verfügung. Diese Reaktion geht ebenfalls mit einer Translokation von zwei Protonen pro übertragenem Elektronenpaar einher (IDE et al., 1999). Somit sind beide Teilreaktionen des $F_{420}H_2$:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systems an den Aufbau eines elektro-chemischen Gradienten gekoppelt, welcher zur ATP-Synthese genutzt werden kann (MÜLLER et al., 1999). Die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase stellt damit die initiale Komponente des membrangebundenen $F_{420}H_2$:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systems dar. Analog dazu läuft der Elektronentransport im H_2 :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System ab mit dem Unterschied, dass hier die F_{420} -nichtreduzierende Hydrogenase die initiale Komponente darstellt.

Im Gegensatz zur H_2 - und F_{420} -abhängigen Heterodisulfid-Reduktion ist die Kenntnis über die Reduktion des Heterodisulfids durch reduziertes Ferredoxin eher gering (PEER et al., 1994;

MEUER et al., 1999). Eine direkte Messung der Protonen-translokation durch das Fd_{red} :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System ist bisher noch nicht erfolgt. Jedoch gibt es indirekte Hinweise, dass auch das dritte Elektronen-transportsystem in der Lage ist, einen elektrochemischen Protonengradienten aufzubauen.

4.1.4 Die Komponenten der Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systeme

Die F_{420} -nichtreduzierende Hydrogenase, die Heterodisulfid-Reduktase und die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase sind redox-getriebene Protonenpumpen, die pro trans-feriertem Elektronenpaar zwei Protonen über die Cytoplasmamembran translozieren. Bei der Methanogenese aus Acetat wird vermutet, dass ein weiteres Enzym, die sogenannte Ech-Hydrogenase, an der Energiegewinnung durch das Fd_{red} :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System beteiligt ist (KÜNKEL et al., 1998).

4.1.4.1 Die F_{420} -nichtreduzierende Hydrogenase

Hydrogenasen generieren während des Wachstums auf H_2 und CO_2 Reduktionsäquivalente aus H_2 , welche für reduktive Biosynthesewege und die Elektronentransport-Phosphorylierung benötigt werden. Damit übernehmen sie eine wichtige Rolle in methanogenen Archaea (THAUER, 1998). In methylotrophen methanogenen Organismen, wie *Ms. mazei* wurden drei verschiedene, sogenannte Nickel-Eisen-Hydrogenasen beschrieben. Zum einen die cytoplasmatischen F_{420} -abhängigen Hydrogenasen, welche den zentralen methanogenen Elektronen-überträger das F_{420} und auch den künstlichen Elektronenakzeptor Methylviologen reduzieren können (MICHEL et al., 1995). Diese Hydrogenase ist nicht an der Energiegewinnung beteiligt. Der zweite Typ reagiert hingegen nicht mit F_{420} (F_{420} -nichtreduzierende Hydrogenase), kann jedoch Methylviologen als künstlichen Elektronenakzeptor nutzen (REEVE und BECKLER, 1990). Kürzlich wurde ein dritter Typ von Nickel-Eisen-Hydrogenasen entdeckt, welcher als Ech-Hydrogenase bezeichnet wurde (KÜNKEL et al., 1998). Alle drei genannten Hydrogenasen weisen einen gemeinsamen Kern auf, der aus zwei Protein-Untereinheiten besteht. Die kleinere Untereinheit ist für den Elektronentransport zuständig, und die große Untereinheit stellt mit einem aktiven Nickel-Eisen-Zentrum das katalytische Zentrum. Für die verschiedenen physiologischen Aufgaben sind die methanogenen [Ni-Fe]-Hydrogenasen mit zusätzlichen Untereinheiten ausgestattet. So wird die F_{420} -nichtreduzierende Hydrogenase aus *Ms. mazei* und anderen *Methanosarcina* Stämmen von dem *rho*-Operon (*rhoG*, *rhoA*, *rhoC*) codiert. Die beiden Gene *rhoG* und

whoA codieren für die kleine und die große Untereinheit der Nickel-Eisen-Hydrogenase. Der zusätzliche offene Leserahmen *whoC* codiert hingegen für ein membranständiges Cytochrom *b* (DEPPENMEIER et al., 1995). Anhand der Kristallstruktur der homologen bakteriellen Nickel-Eisen-Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* (VOLBEDA et al., 1995) und Immunogold-Labeling Experimenten mit der Nickel-Eisen-Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* (EISMANN et al., 1995) können nach DEPPENMEIER (2002) folgende Rückschlüsse auf die Struktur und die Funktion der F₄₂₀-nichtreduzierende Hydrogenase aus *Methanosarcina* Stämmen gemacht werden:

Die F₄₂₀-nichtreduzierende Hydrogenase besteht aus drei Untereinheiten. Die kleine Untereinheit mit einer molekularen Masse von 40 kDa koordiniert ein [3Fe-4S]-Zentrum und zwei [4Fe-4S]-Zentren. Sie weist ein Signalpeptid für den Transport über die Cytoplasmamembran und eine hydrophobe C-terminale Domäne als Membrananker auf, somit ist sie vermutlich auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran lokalisiert. Die große Untereinheit (60 kDa) koordiniert das katalytische [Ni-Fe]-Zentrum, sie verfügt über kein Signalpeptid und wird vermutlich zusammen mit der kleinen Untereinheit über die Cytoplasmamembran transportiert. Die dritte Untereinheit, das Cytochrom *b* ist in der Cytoplasmamembran lokalisiert. Die periplasmatische Lokalisation des aktiven Zentrums der F₄₂₀-nichtreduzierenden Hydrogenase ist wichtig für den Mechanismus der Protonentranslokation, da hier skalare Protonen produziert werden. Diese werden wie folgt erzeugt: Im ersten Schritt wird molekularer Wasserstoff auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran durch das bimetallische Ni/Fe-Zentrum oxidiert. Die entstehenden Protonen werden in das Periplasma entlassen. Die anfallenden Elektronen werden auf die Eisen-Schwefel-Zentren der kleinen Untereinheit übertragen und von diesen auf die Häm-Gruppe des membranintegralen Cytochrom *b* transferiert. Um die Reaktion abzuschließen sollte das Cytochrom *b* zwei cytoplasmatische Protonen aufnehmen, um so den membranintegralen Elektronen-überträger, das Methanophenazin zu reduzieren. Auf diesem Wege könnten zwei skalare Protonen produziert werden.

4.1.4.2 Die Heterodisulfid-Reduktase

Wie schon erwähnt katalysiert die Heterodisulfid-Reduktase den terminalen Schritt der anaeroben Atmungskette methanogener Organismen, die Reduktion des Heterodisulfids. Das Enzym der methylophilen Organismen *Ms. barkeri* (HEDDERICH et al., 1990; KÜNKEL et al., 1997) und *Ms. thermophila* (SIMIANU et al., 1998) besteht aus zwei Untereinheiten (HdrD, HdrE). Die membranintegrale Untereinheit HdrE stellt ein *b*-Typ Cytochrom dar, und die größere Untereinheit HdrD koordiniert zwei [4Fe-4S]-Zentren, mit unterschiedlichen Standard-Redoxpotentialen (-100 mV, -400 mV) und trägt das aktive Zentrum für die Heterodisulfid Reduktion. Es wird vermutet, dass lediglich ein [4Fe-4S]-Zentrum das Reaktionszentrum bildet und direkt mit dem Heterodisulfid interagiert (DUIN et al., 2002). Die Energiekonservierung durch die Heterodisulfid-Reduktase der methylophilen Methanogenen wird vermutlich, ähnlich wie bei der F₄₂₀-nichtreduzierenden Hydrogenase, durch die Bildung skalarer Protonen bewerkstelligt. Danach werden die Reduktionsäquivalente von dem reduzierten Methanophenazin bereitgestellt und auf die 1-Elektronenakzeptoren, das Häm *b* und die [Fe-S]-Zentren übertragen. Die Protonen werden an der Außenseite der Cytoplasmamembran freigesetzt. Die Elektronen gelangen dann in das aktive Zentrum, wo sie zur Reduktion des Heterodisulfid genutzt werden. Vermutlich werden die für diese Reaktion benötigten Protonen aus dem Cytoplasma bezogen. Somit entstehen an der Außenseite der Cytoplasmamembran zwei skalare Protonen, die zum Aufbau des elektrochemischen Protonengradienten beitragen (DEPPENMEIER, 2002 b). Bei der Reduktion des Heterodisulfids besteht das Problem, dass 1-Elektronenüberträger (die [Fe-S]-Zentren), die Sulfid-Bindung des Heterodisulfids spalten müssen. Diese Spaltung geschieht meist über eine nukleophile Substitution, die gewöhnlich von Pyridin-Nukleotid:Disulfid-Oxidoreduktasen katalysiert werden. Diese Enzyme enthalten meist FAD, welches den Elektronentransfer von NAD(P)H auf die Disulfid-Bindung vermittelt. Da die Heterodisulfid-Reduktasen aus methylophilen Methanogenen kein FAD enthalten, muss die Reduktion des Heterodisulfids durch zwei 1-Elektronen-Übergänge bewerkstelligt werden (DUIN et al., 2002).

4.1.4.3 Die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase

Die interessanteste Komponente der Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systeme der methanogenen Organismen ist die in dieser Arbeit analysierte F₄₂₀H₂-Dehydrogenase. Die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase stellt bei der Methanogenese von Methanol zu CH₄ und CO₂ in methylotrophen, methanogenen Organismen die initiale Komponente des membrangebundenen F₄₂₀H₂:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systems dar. Dieses System katalysiert die F₄₂₀H₂-abhängige Heterodisulfid-Reduktion, wodurch die Coenzyme HS-CoM, HS-CoB und F₄₂₀ regeneriert werden. Methanophenazin ist der direkte Elektronenakzeptor der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase und stellt somit die Verbindung zwischen der initialen Dehydrogenase und der terminalen Reduktase her. Während dieser F₄₂₀H₂-abhängigen Reduktion des Methanophenazins transloziert das Enzym zwei Protonen über die Cytoplasmamembran (DEPPENMEIER et al., 1990; ABKEN und DEPPENMEIER, 1997; BÄUMER et al., 2000). Die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase ist ein aus bis zu 13 Untereinheiten bestehender Komplex, der auffallende Homologien zu Untereinheiten des Komplex I der Atmungskette aus Eu- und Prokaryonten aufweist. Da von diesem Komplex I, als einzigem Komplex der Atmungskette noch keine 3D-Struktur vorliegt, war es Ziel dieser Arbeit einzelne Untereinheiten der F₄₂₀H₂-Dehydrogenasen aus *A. fulgidus* und *Methanosarcina* heterolog in *E. coli* zu produzieren. Diese sollten aufgereinigt werden, um anschließend mit den homogen vorliegenden Enzymen Kristallisationsstudien zur Lösung der Kristallstruktur dieser Untereinheiten vorzunehmen. Im Folgenden soll ein Überblick der bisherigen Aufreinigungserfolge der F₄₂₀H₂-Dehydrogenasen gegeben werden.

Die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase wurde bisher aus drei Organismen isoliert (HAASE et al., 1992; KUNOW et al., 1994; ABKEN und DEPPENMEIER, 1997). Das Enzym aus *Ml. tindarius* besteht aus fünf Untereinheiten mit den molekularen Massen von 45, 40, 22, 18 und 17 kD, somit beträgt seine Gesamtmasse 120 kDa (HAASE et al., 1992). Als redox-aktive Gruppen konnten in diesem Enzym Eisen-Schwefel-Zentren nachgewiesen werden. Flavine konnten jedoch nicht detektiert werden. Vermutlich wurden diese während der Aufreinigung abgetrennt. Die Flavine dienen nach MASSEY und HEMMERICH (1980) den Dehydrogenasen, die Elektronen auf Eisen-Schwefel-Zentren oder Cytochrome übertragen, als Mediatoren beim Transfer von Hydridionen auf 1-Elektronenüberträger. Coenzym F₄₂₀ ist im Hinblick auf seine chemische Struktur als ein obligater Hydridionen-Überträger anzusehen (WALSH, 1986). Somit muss auch die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase Flavine enthalten, wenn sie die von dem reduzierten F₄₂₀H₂ angelieferten Elektronen auf die [Fe-S]-Zentren übertragen soll. Von diesem Elektronentransfer wird im Fall der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase ausgegangen

(DEPPENMEIER et al., 1996). Daher kann man annehmen, dass auch die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *Ml. tindarius* in vivo Flavine enthält, die jedoch im Zuge der Reinigung verloren gingen.

Die in dieser Arbeit untersuchten F₄₂₀H₂-Dehydrogenasen aus *Ms. mazei* und *Ms. acetivorans* sind dem Enzym aus *Ml. tindarius* sehr ähnlich (ABKEN und DEPPENMEIER, 1997, diese Arbeit). Die gereinigten Proteine weisen eine molekulare Masse von 115 kDa auf und bestehen aus ebenfalls fünf Untereinheiten (40, 37, 22, 20 und 16 kDa). In dem Enzym konnten Eisen-Schwefel-Zentren und auch FAD nachgewiesen werden. Der Gehalt an Nicht-Häm-Eisen und säurelabilem Schwefel betrug 16 mol pro mol aufgereinigtem Enzym. Die gereinigte F₄₂₀H₂-Dehydrogenase wurde einer Säure- bzw. Hitzeextraktion unterzogen und der Flavingehalt der proteinfreien Extrakte mittels Fluoreszenzspektroskopie und RP-HPLC bestimmt (ABKEN, 1997). Es ergab sich ein FAD-Gehalt von 0,2 mol FAD pro mol F₄₂₀H₂-Dehydrogenase. Dieser geringe Flavingehalt legte die Vermutung nahe, dass während der Reinigung ein Großteil des Flavins abgetrennt wurde (ABKEN und DEPPENMEIER, 1997). Die Untereinheiten des Enzyms aus *Ms. mazei* Göl werden durch die Gene des *fpo*-Operons kodiert, das aus den Genen *fpoA*, B, C, D, H, I, J, K, L, M, N, O besteht (s. Abb. 65; BÄUMER et al., 2000). Mittels einer N-terminalen Ansequenzierung der aufgereinigten Untereinheiten konnte nachgewiesen werden, dass diese mit den N-Termini der abgeleiteten Amino-säuresequenzen von *fpoB*, C, D und I identisch waren. Das Gen, das für die 37 kDa-Untereinheit (FpoF) des gereinigten Enzyms kodiert, ist nicht Teil des *fpo*-Operons, sondern an einer anderen Stelle des Genoms lokalisiert (siehe Abb. 66; BÄUMER et al., 2000). Da das von ABKEN und DEPPENMEIER (1997) aufgereinigte Enzym nur aus fünf Untereinheiten bestand, das Operon jedoch zwölf Gene aufweist, ist anzunehmen, dass im Fall der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *Ms. mazei* lediglich ein Subkomplex aufgereinigt wurde. Auch die *Methanosarcina* Stämme *Ms. barkeri* und *Ms. acetivorans* verfügen über ein *fpo*-Operon. Die Genomsequenzdaten dieser methanogenen Organismen zeigten, dass die Gene *fpoA-N* und *fpoF* (an anderer Stelle im Genom) fast 100 %ig identisch zu den oben erwähnten Genen aus *Ms. mazei* sind, die für die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase kodieren. Auch die Genorganisation ist in den drei genannten *Methanosarcina* Arten gleich. Das Gen für die F-Untereinheit ist in allen Stämmen nicht im *fpo*-Operon organisiert (siehe Abb. 66). In dieser Arbeit wurde die Untereinheit F aus *Ms. acetivorans* heterolog in *E. coli* überexprimiert (siehe 3.2.2.1) und über einen Strep-Tag aufgereinigt (siehe 3.2.2.2). Die molekulare Masse des Proteins betrug unter denaturierenden Bedingungen 38 kDa. Der spektroskopisch ermittelte Flavingehalt des Fusionsproteins lag bei 0,92 mol Flavin pro mol Protein. Dies ist deutlich mehr als die 0,2

mol FAD die von ABKEN und DEPPENMEIER (1997) im aufgereinigten Subkomplex von *Ms. mazei* ermittelt werden konnten. Somit bestätigt sich die Vermutung, dass das FAD während der Aufreinigung des Subkomplexes aus *Ms. mazei*, abgetrennt wurde. Der ermittelte Gehalt von Nicht-Häm-Eisen und säurelabilem Schwefel betrug 8 bzw. 7 mol pro mol FpoF-Protein. Dieses Ergebnis spricht für das Vorhandensein von zwei vierkernigen Eisen-Schwefel-Zentren, wie sie auch aus den Bindemotiven der Aminosäuresequenz vorausgesagt wurden (siehe Tab. 10). Das aufgereinigte FpoF-Fusionsprotein konnte reduziertes F₄₂₀ oxidieren und die anfallenden Elektronen auf den künstlichen Elektronenakzeptor Methylviologen plus Metronidazol (MV/MTZ) übertragen. Für das FpoF konnte dabei eine spezifische Aktivität von 10 U pro mg Protein bei Raumtemperatur ermittelt werden. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass das Fpo F Protein als Inputmodul der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *Ms. acetivorans* fungiert. Des Weiteren wurde auch die Untereinheit FpoO aus *Ms. mazei* in dieser Arbeit heterolog in *E. coli* überproduziert (siehe 3.2.3.1) und als Fusionsprotein aufgereinigt (siehe 3.2.3.2). Diese Untereinheit wurde erstmals in dieser Arbeit überproduziert und charakterisiert. Die Aufreinigung ergab, dass es sich bei der FpoO Untereinheit um ein 16 kDa großes Protein handelt, welches mindestens ein sauerstofflabiles, zweikerniges Eisen-Schwefel-Zentrum aufweist (siehe 3.3.1.1 und 3.3.1.2). Das Vorkommen der O-Untereinheit scheint auf *Methanosarcina*-Arten beschränkt zu sein, da das FpoO Protein keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen aufweist. Das für diese Untereinheit kodierende Gen ist jedoch auch in dem *fpo*-Operon von *Ms. barkeri* und *Ms. acetivorans* zu finden.

Die dritte F₄₂₀H₂-Dehydrogenase wurde von KUNOW et al. (1994) aus dem sulfatreduzierenden, extrem thermophilen Archaeon *A. fulgidus* isoliert. Der aus diesem Organismus aufgereinigte Komplex besitzt eine molekulare Masse von 270 kDa und setzt sich aus sieben Untereinheiten (56, 45, 41, 39, 37 und 33 kDa) zusammen. Im gereinigten Enzym konnten 1,6 mol FAD, 9 mol Nicht-Häm-Eisen und 7 mol säurelabiler Schwefel pro mol Enzym nachgewiesen werden. Im Zuge des Genomprojekts von *A. fulgidus* wurden die Gene, die für die Untereinheiten der F₄₂₀H₂:Chinon-Oxidoreduktase kodieren, sequenziert (KLENK et al., 1997). Es zeigte sich, dass alle Gene, die für die Untereinheiten der F₄₂₀H₂-Dehydrogenasen (FqoJ, K, L, M, N, A, B, C, D, H, I, F) kodieren, in einem Operon, dem *fqo*-Operon organisiert sind (siehe Abb. 65). Auch hier ergab sich eine Differenz zwischen der Anzahl der Untereinheiten des gereinigten Enzyms und der Zahl an Genen im zugehörigen Operon, woraus zu schließen war, dass auch hier nur ein Subkomplex aufgereinigt wurde. Außerdem stellte sich nach einem Vergleich der N-Termini der aufgereinigten Untereinheiten mit der aus den Genen abgeleiteten Aminosäuresequenz heraus, dass lediglich die 45 und 33

kDa großen Untereinheiten des aufgereinigten Komplexes mit den Genprodukten des Operons, *fqoD* (46,8 kDa) und *fqoI* (28,6 kDa) übereinstimmten. Das Operon zeigt in seiner Organisation starke Ähnlichkeiten zu dem *fpo*-Operon. Jedoch ist das Gen, das für die F Untereinheit kodiert, innerhalb des Operons lokalisiert (BRÜGGEMANN et al., 2000; siehe Abb. 65).

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Gene *fqoF* und *fpoF* zeigen Ähnlichkeiten zu Untereinheiten von F_{420} -reduzierenden Hydrogenasen (HALBOTH und KLEIN, 1992) und F_{420} -abhängigen Formiat-Dehydrogenasen (BULT et al., 1996; SMITH et al., 1997). FqoF und FpoF sind daher offenbar die $F_{420}H_2$ -oxidierenden Untereinheiten der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen. Auch die FqoF Untereinheit konnte in *E. coli* überproduziert werden (BRÜGGEMANN et al., 2000; diese Arbeit siehe 3.2.1.2 und 3.2.1.3). Das Enzym wurde bis zur Homogenität aufgereinigt und hatte unter denaturierenden Bedingungen eine molekulare Masse von 39 kDa. In dieser Arbeit wurde das Fqo F Protein zusätzlich mittels eines Strep-Tags isoliert (siehe 3.2.1.3). Der von BRÜGGEMANN et al. (2000) ermittelte FAD-Gehalt betrug 0,7 mol FAD pro mol Protein und der Gehalt an Nicht-Häm-Eisen und säurelabilem Schwefel 10,6 und 7,2 mol pro mol Protein. Dies legt die Vermutung nahe, dass die FqoF Untereinheit mindestens zwei [4Fe-4S]-Zentren und ein FAD-Molekül als redox-aktive Gruppen trägt. Die $F_{420}H_2$ -abhängige Dehydrogenase-Aktivität konnte mit 64 U/mg bei einer Temperatur von 78 °C ermittelt werden. Die Aktivität bei Raumtemperatur war etwa um den Faktor sieben geringer. Diese Ergebnisse decken sich in der Tendenz mit den in dieser Arbeit für das FqoF Protein ermittelten Werten. So konnte in dieser Arbeit für das mittels Hitzebehandlung aufgereinigte Protein ein FAD-Gehalt von 0,92 mol FAD und für das Fusionsprotein ein Gehalt von 1,0 mol pro mol Protein ermittelt werden (siehe 3.3.2). Der Anteil von Nicht-Häm-Eisen und säurelabilem Schwefel betrug bei beiden Proteinen 7 und 14 mol pro mol Protein (siehe 3.3.1.1 und 3.3.1.2). Die spezifische Aktivität bei Raumtemperatur konnte mit 7,4 U/mg für das hitzebehandelte Protein und 6,0 U/mg für das Fusionsprotein (siehe 3.2.1.2.6 und 3.2.1.3.3) ermittelt werden. Bei einer Erhöhung der Temperatur auf 80°C konnte ebenfalls eine Aktivitätssteigerung um den Faktor sieben beobachtet werden (SCHMIDT, 2002). Des Weiteren konnte kürzlich ein Subkomplex bestehend aus den Untereinheiten FqoB/C und D heterolog in *E. coli* überproduziert werden (FALINSKI, 2003). Auf den Aufbau und die Funktion der verschiedenen Untereinheiten der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase soll im nächsten Kapitel mittels eines Vergleichs der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase mit der NADH:Chinon-Oxidoreduktase (Komplex I), näher eingegangen werden.

4.2 Die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase und die NADH:Chinon-Oxidoreduktase im Vergleich

Wie schon im Kapitel 3 erwähnt, ergab der Vergleich der für die F₄₂₀H₂-Dehydrogenasen kodierenden Operone und der daraus abgeleiteten Untereinheiten aus *A. fulgidus*, *Ms. mazei* Gö1 und *Ms. acetivorans* auffallende Ähnlichkeiten zu den Untereinheiten des Komplex I der Atmungskette aus Pro- und Eukaryonten. Neben der Homologie der Untereinheiten weisen diese Komplexe weitere Gemeinsamkeiten auf (YAGI et al., 1998; BÄUMER et al., 2000). Die NADH:Chinon-Oxidoreduktase (Komplex I) in Pro- und Eukaryonten ist wie die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase die initiale Komponente eines membrangebundenen Elektronentransportsystems und katalysiert den Elektronentransfer von NADH auf Ubichinon oder im Fall von fakultativ anaeroben Bakterien auf Menachinon. Die Elektronendonatoren F₄₂₀H₂ und NADH sind reversible Hydrid-Ionen-Donatoren mit vergleichbaren Standard-Redoxpotentialen. Beide Proteine besitzen einen komplexen Aufbau und bestehen aus einer Vielzahl von Untereinheiten, welche über zahlreiche Eisen-Schwefel-Zentren und ein nicht kovalent gebundenes Flavin verfügen. Außerdem nutzen beide Komplexe kleine hydrophobe, in der Membran mobile Elektronenakzeptoren. Im Fall der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase handelt es sich entweder um ein spezielles Menachinon (*A. fulgidus*) oder um Methanophenazin (*Methanosarcina*-Spezies). Der Komplex I überträgt die Elektronen auf Chinone. Schließlich handelt es sich bei beiden Komplexen um redox-getriebene Protonen-pumpen, die sich durch Diphenyliodonium (DPI) hemmen lassen. Der mitochondriale Komplex I besteht aus bis zu 45 verschiedenen Untereinheiten, wobei einigen noch keine eindeutige Funktion zugewiesen werden konnte. Der bakterielle Komplex I hingegen verfügt mit seinen 13-14 Untereinheiten über alle katalytisch aktiven Komponenten und transloziert mit der selben Effizienz wie das mitochondriale Protein Protonen nach außen. Aus diesem Grund wird das bakterielle Enzym als ein ideales Modell zur Untersuchung des Mechanismus des Elektronentransports und der Protonentranslokation im Komplex I angesehen.

In *E. coli* wird der Komplex I durch das sogenannte *nuo*-Operon kodiert (WEIDENER et al., 1993; siehe Abb. 65). Es beinhaltet 13 Gene, die als *nuoA*, B, CD, E, F G, H, I, J, K, L, M, und N bezeichnet werden, wobei die Gene *nuoC* und *nuoD* fusioniert sind. Die Untereinheiten der NADH:Chinon-Oxidoreduktase aus *E. coli* kann man in drei verschiedene Module einteilen. Die hydrophilen Untereinheiten NuoEFG katalysieren die Oxidation von NADH und werden als Inputmodul oder NADH-Dehydrogenase-Fragment bezeichnet. Dieses Modul

trägt ein nicht kovalent gebundenes FMN, die Bindestelle für das NADH und EPR-detektierbare Eisen-Schwefel-Zentren. Die Untereinheiten NuoBCDI bilden das amphipatische Fragment, auch als membranassoziiertes Fragment bezeichnet. Es verbindet das membranintegrale Fragment mit dem Inputmodul. Das membranassoziierte Modul koordiniert drei [4Fe-4S] und sorgt so für den Elektronentransfer von dem Input-modul auf das membranintegrale Fragment. Das membranintegrale Modul wird von den hydrophoben Untereinheiten NuoAHJKLMN gebildet und ist an der Reduktion des Chinons und der Protonentranslokation beteiligt.

Aufgrund dieser weitreichenden Gemeinsamkeiten zwischen der NADH:Chinon-Oxidoreduktase aus *E. coli* und der in dieser Arbeit untersuchten $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen aus *A. fulgidus* und *Ms. mazei* Gö1 bzw. *Ms. acetivorans* soll im Folgenden durch einen detaillierten Vergleich der drei Subkomplexe beider Enzyme diskutiert werden, wie der Elektronentransport, die Protonentranslokation sowie die Bindung des Elektronenakzeptors in der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase erfolgen könnte. Nach dem von BRÜGGEMANN et al. (2000) und BÄUMER et al. (2000) vorgeschlagenen Modell, lassen sich auch die Untereinheiten der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase in Analogie zur NADH:Chinon-Oxidoreduktase in drei Module einteilen (siehe Abb. 65).

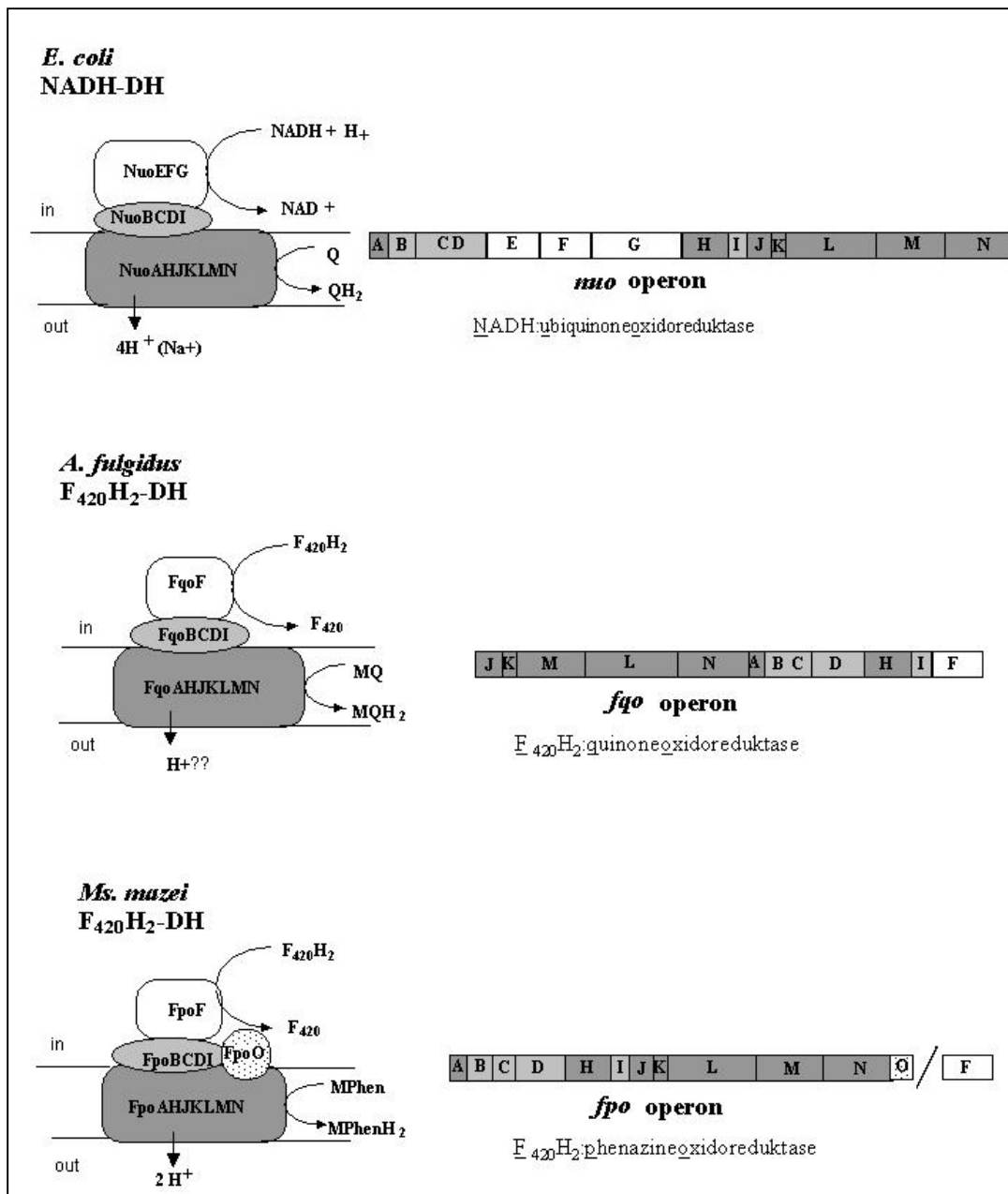


Abb.65 : Darstellung der Gencluster der NADH-Dehydrogenase aus *E. coli* sowie der F₄₂₀H₂-Dehydrogenasen aus *A. fulgidus* und *Ms. mazei*
nuo-Gencluster von *E. coli* (WEIDNER et al., 1993, modifiziert)
fqo-Gencluster von *A. fulgidus* (BRÜGGEMANN et al., 2000)
fpo-Gencluster von *Ms. mazei* (BÄUMER et al., 2000)

Farbcode der in Abb. 65 unterlegten Flächen

Nur in *Methanosarcina* vorkommendes Gen



Gene und Untereinheiten des membranassoziierten Moduls



Gene und Untereinheiten des membranintegralen Moduls



Gene und Untereinheiten des Inputmoduls



4.2.1 Das Inputmodul

Das sogenannte Inputmodul der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase von *Methanosarcina*-Spezies und *A. fulgidus* besteht aus der Untereinheit FpoF bzw. FqoF und ist für die Bindung und die Oxidation von $F_{420}H_2$ verantwortlich. Das Inputmodul von *E. coli* hingegen setzt sich aus den wasserlöslichen Untereinheiten NuoE, F und G zusammen und katalysiert die Bindung und die Oxidation von NADH.

Die Elektronen-einspeisenden Module der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen sind die einzigen Subkomplexe, die keine Homologien zum Komplex I aufweisen und unterschiedlichen evolutionären Ursprungs sind. Für den Komplex I konnten weitreichende Homologien zwischen dem NADH-Dehydrogenase-Fragment und dem Diaphorase-Dimer der NAD-abhängigen, löslichen Hydrogenase von *Alcaligenes eutrophus* nachgewiesen werden. Diese besteht aus einer α - und einer γ -Untereinheit. Es zeigte sich, daß der N-Terminus der α -Untereinheit homolog zu NuoE ist. Außerdem zeigte der C-Terminus der γ -Untereinheit zu NuoE Homologien und der N-Terminus der γ -Untereinheit zeigte zu NuoG hohe Sequenzähnlichkeiten (FINEL, 1998). Für die F-Untereinheiten der F_{420} -Dehydrogenasen wurden dagegen Homologien zur β -Untereinheit von F_{420} -abhängigen Hydrogenasen gefunden (WESTENBERG et al., 1999; BÄUMER et al., 2000). Interessanterweise ist das *fpoF*-Gen im Gegensatz zu *nuoEFG* und *fqoF* nicht in dem *fpo*-Operon organisiert, sondern befindet sich an einer anderen Stelle im Genom. Aus den Genom-Sequenzdaten von *Ms. mazei*, *Ms. acetivorans* und *Ms. barkeri* (DEPPENMEIER et al., 2002; GALAGAN et al., 2002, Joint Genome Institute, <http://www.jgi.doe.gov/>) ergab sich, dass das *fqoF*-Gen in allen drei Organismen von den Genen für eine F_{420} -abhängige N^5, N^{10} -Methylen H_4 MPT Reduktase und eine Nicotinamid-Nukleotid-Adenylyl-Transferase flankiert wird (siehe Abb. 66.) Trotz unterschiedlichen evolutionären Ursprungs haben beide Inputmodule Gemeinsamkeiten. Sie erfüllen beide die Aufgabe der Substratbindung und -oxidation und verfügen über Flavine und Eisen-Schwefel-Zentren. Alle bekannten FpoF-homologen Untereinheiten haben Sequenzmotive für zwei [4Fe-4S]-Zentren (siehe Tab. 10), während im NuoEFG-Subkomplex zwei [2Fe-2S]-Zentren (N1b, N1c) und drei [4Fe-4S]-Zentren (N3, N4, N5) durch EPR-Studien detektiert werden konnten.

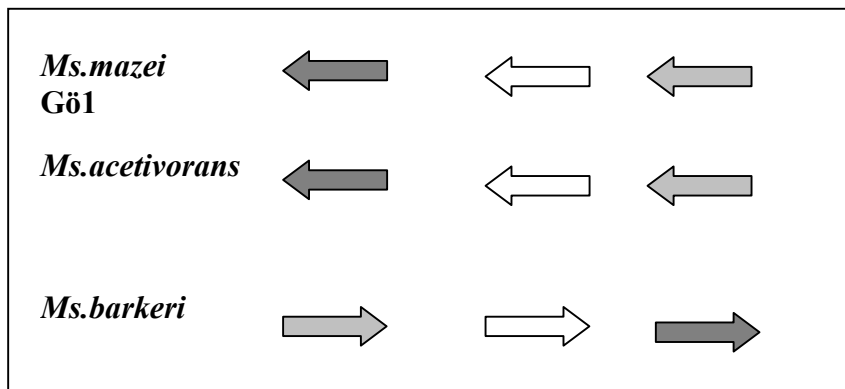


Abb. 66: Schematische Darstellung der das *fpoF*-Gen flankierenden Gene

die Gene kodieren für folgende Genprodukte:

- Coenzyme F_{420} -abhängige N^5,N^{10} -Methyle tetrahydromethanopterin Reduktase
- $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase Untereinheit FpoF
- Nicotinamid-Nukleotid-Adenylyl-Transferase

4.2.1.1 Die Flavine der Inputmodule

In den Inputmodulen kommen Riboflavin-5'-phosphat (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) vor. Die Flavine sind fest aber nicht kovalent gebunden und vermitteln, wie schon erwähnt, den Elektronentransfer von den 2-Elektronendonatoren $F_{420}H_2$ bzw. NADH auf die 1-Elektronenüberträger, die Eisen-Schwefel-Zentren. So weist die Untereinheit NuoF des Inputmoduls von *E. coli* ein Bindemotiv für FMN in der Primärsequenz auf: $GAG^R/A Y^I/V CG^D/E E$ (WEIDNER et al., 1993). Da aber an der Bindung des FMN mehrere Proteine beteiligt sind, kann die Primärsequenz hier nur ein sehr unzureichendes Bild geben. Eine genaue Lokalisierung der Bindestelle für die Flavine kann nur eine Röntgenstrukturanalyse ergeben. Gleiches gilt für die Bindestelle des NADH. In den F Untereinheiten der F_{420} -Dehydrogenasen ist hingegen ein FAD gebunden (ABKEN und DEPPENMEIER, 1997; BRÜGGEMANN et al., 2000; diese Arbeit). Das gebundene Flavin kann je nach Redox-Status als oxidiertes Flavin-Benzochinon, als radikales Flavin-Semichinon oder als reduziertes Flavin-Hydrochinon im Protein vorliegen (siehe Abb. 67).

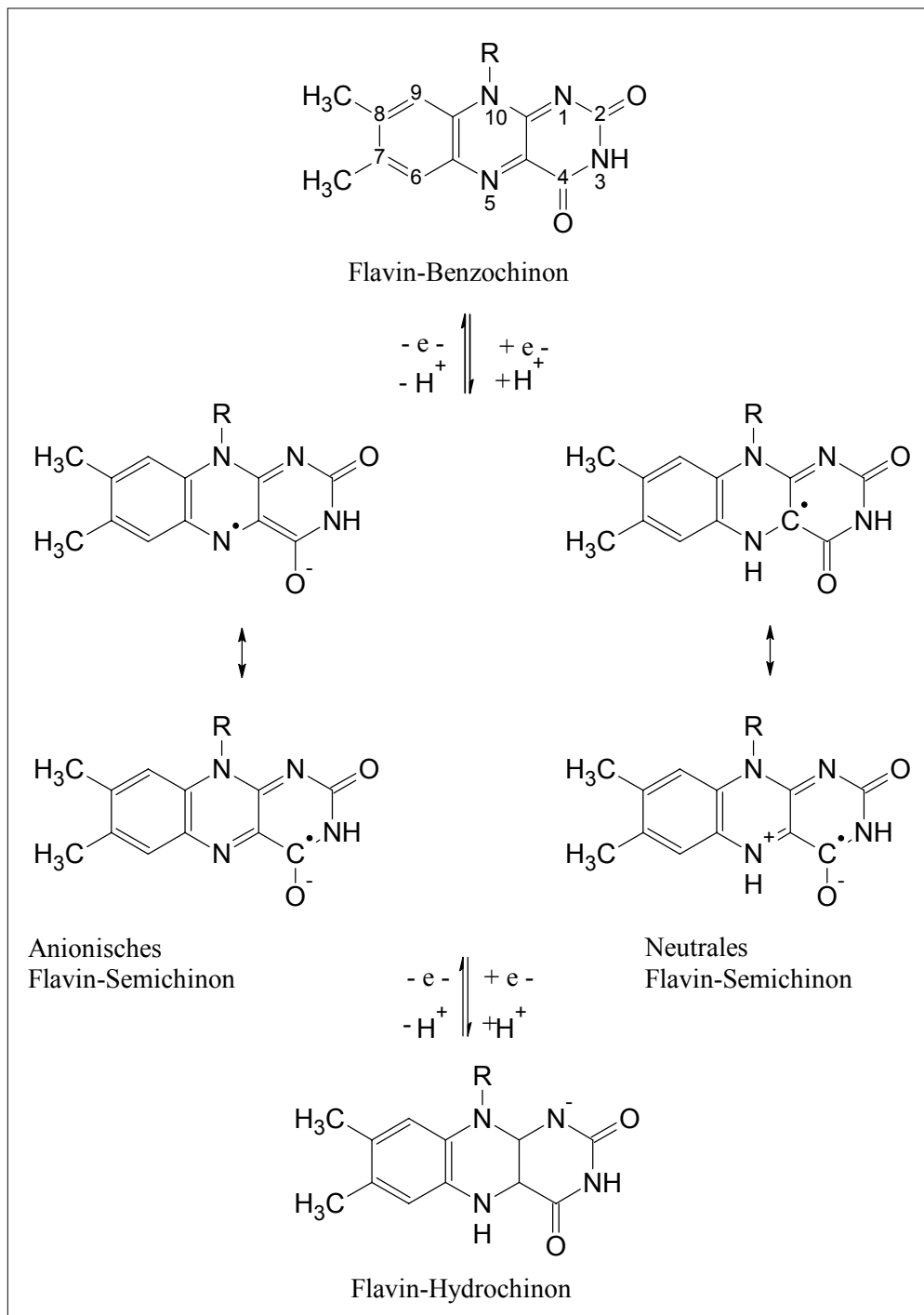


Abb. 67: Struktur und Redoxsystem biologischer Flavine

Mittels EPR-Spektroskopie ist nur die freie Radikal-Form, das Flavin-Semichinon detektierbar. So weist ein Flavin-Radikal ein isotropes EPR-Signal mit einem g-Wert von 2,005 auf. Das EPR-Spektrum des mittels Potentiometrie erhaltenen, freien Flavin-Radikals des Komplex I zeigt ein ungewöhnlich breites Signal mit einer Linien-Breite von 2,4 mT (Tesla, Feldstärke). Dies wird vor allem auf eine Spin-Spin-Interaktion mit dem [4Fe-4S]-

Zentrum N3 (siehe 4.2.1.2), welches ebenfalls auf der Untereinheit F lokalisiert ist, zurückgeführt (OHNISHI, 1998). Nach PALMER et al. (1971), weisen neutrale Semichinone eine Linien-Breite von etwa 2,0 mT und anionische eine Linien-Breite von ca. 1,5 mT auf. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten EPR-Untersuchungen der F-Untereinheiten der F₄₂₀-Dehydrogenasen (siehe 3.3.4) konnte ein isotropes EPR-Signal mit einem g-Wert von 2,006 nach der Reduktion der Proteine mit einem Überschuss an Natrium-Dithionit detektiert werden. Bei diesem Signal könnte es sich um ein durch Reduktion erzeugtes Flavin-Semichinon handeln. Ob das Signal durch ein neutrales oder ein anionisches Semichinon erzeugt wurde, muß erst noch durch weitere EPR-Analysen ermittelt werden.

Außerdem besitzen Flavine im UV/Vis-Spektrum charakteristische Absorptionseigenschaften. Das gebundene FMN im NADH-Dehydrogenase-Fragment dominiert mit seiner Absorption bei 370 und 455 nm im oxidierten Zustand das UV/Vis-Spektrum des Inputmoduls aus *E. coli* (RASMUSSEN et al., 2001). Ebenso wird das UV/Vis-Spektrum der F-Untereinheiten der F₄₂₀H₂-Dehydrogenasen durch FAD dominiert. Die Absorption des FAD bei 370 und 450 nm konnte durch Reduktion der Inputmodule mit Pt/H₂ gebleicht werden. Nach einer Reoxidation mit O₂ nahm die Absorption der Proteine in diesem Bereich wieder zu (siehe 3.3.3.1 und 3.3.3.2 in dieser Arbeit).

4.2.1.2 Die Eisen-Schwefel-Zentren der Inputmodule

Das NADH-Dehydrogenase-Fragment aus *E. coli*, besteht aus den Untereinheiten NuoE, F und G und trägt Bindemotive für sechs Eisen-Schwefel-Zentren (siehe Tab.9). Fünf dieser Zentren ließen sich mittels EPR-Spektroskopie detektieren (LEIF et al., 1995). Die Untereinheit E trägt ein Bindemotiv für die Koordination des [2Fe-2S]-Zentrums N1a. Dieses Zentrum ließ sich im *E. coli* Komplex nicht detektieren, jedoch konnte im NuoE Homolog aus *Paracoccus denitrificans* dieses Zentrum nachgewiesen werden. Da die *P. denitrificans* Untereinheit (Nqo2) über das gleiche konservierte Bindemotiv verfügt, kann davon ausgegangen werden, dass auch die NuoE Untereinheit aus *E. coli* das Zentrum N1a trägt (YANO et al., 1994; FRIEDRICH, 2001) Die Untereinheit NuoF trägt das schon angesprochene FMN und ein vierkerniges Eisen-Schwefel-Zentrum (N3). Auf der G-Untereinheit sind zwei [2Fe-2S]-Zentren (N1b und N1c) und zwei [4Fe-4S]-Zentren (N4 und N5) lokalisiert, wobei das Cluster N1c bisher nur in *E. coli* mittels EPR nachgewiesen werden konnte (LEIF et al., 1995). Die vierkernigen Zentren N3 und N4 zeigen EPR Signale für

rhombische Eisen-Schwefel-Zentren. Die zweikernigen Cluster N1a und N1c zeigen ebenfalls eine rhombische Symmetrie, während N1b eine axiale Symmetrie aufweist.

Tabelle 9: Eigenschaften der Eisen-Schwefel-Zentren des Komplex I/NDH I
(nach FRIEDRICH, 1998; FRIEDRICH, 2001)

Zentrum	Cluster Symmetrie	EPR Signalposition			Untereinheit	Komplex I <i>E.coli</i>		[Fe-S] Bindemotive
		g_x	g_y	g_z		Em (mV)	pH abh.	
N1a	[2Fe-2S] rhombisch	1,93	1,94	2,03	NuoE	-330	?	CXXXXCX ₃₅ CXXXC
N1b	[2Fe-2S] axial	1,94	1,94	2,03	NuoG	-230	-	CX ₁₀ CXXCX ₁₃ C
N1c	[2Fe-2S] rhombisch	1,92	1,95	2,00	NuoG	-250	-	CXXCXXXCX ₂₇ C
N2	[4Fe-4S] axial	1,91	1,91	2,05	NuoB?	-220	+	CCX ₆₃ CX ₂₉ CP
N3	[4Fe-4S] rhombisch	1,88	1,92	2,04	NuoF	-270	-	CXXCXXCX ₃₉ C
N4	[4Fe-4S] rhombisch	1,89	1,93	2,09	NuoG	-270	-	CXXCXXCX ₄₂₋₄₃ C
N5	[4Fe-4S]	S = 3/2 ?			NuoG		?	HXXXCXXCXXXXXC
N6a/b	2[4Fe-4S]	nicht detektierbar			NuoI	-270	?	(CXXCXXCXXXCP) ₂

Lange Zeit wurde diskutiert, ob das Zentrum N5 der Untereinheit G wirklich eine prosthetische Gruppe des Komplex I ist, da es in Komplex I Präparationen immer nur in sehr geringen Konzentrationen vorlag. Jedoch geht man davon aus, dass das Cluster N5 möglicherweise größtenteils einen Spin von $S = 3/2$ im Grundzustand besitzt, so dass es zu einer Unterrepräsentation der Spins in der $g = 2,00$ Region kommen könnte (OHNISHI, 1998; FRIEDRICH, 1998; FRIEDRICH, 2001).

Die Inputmodule der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen (FpoF und FqoF) verfügen alle über zwei Bindemotive zur Koordination von zwei vierkernigen [Fe-S]-Zentren ($((C_{xx}C_{xx}C_{xxx}CP)_2)$) (siehe Tab. 10 und Anhang I). Im Gegensatz zu den Eisen-Schwefel-Zentren des Komplex I, die nur im reduzierten Zustand paramagnetisch und somit EPR-detektierbar sind, zeigten die Eisen-Schwefel-Zentren der F-Untereinheiten aus *A. fulgidus* (FqoF) und *Ms. acetivorans* (FpoF) schon im nichtreduzierten Zustand paramagnetisches Verhalten (siehe 3.3.4.1 und 3.3.4.2). Die paramagnetischen Signale für das axiale [4Fe-4S]-Zentrum des FqoF Proteins, mit den g-Werten $g_{x/y} = 2.025$ und $g_z = 2.04$, und das axiale Zentrum der FpoF Untereinheit ($g_{x/y} = 2,015$ und $g_z = 2,03$) verschwanden nach Reduktion mit Natrium-Dithionit wieder und wurden diamagnetisch. Im reduzierten Zustand zeigte das FqoF-Protein Signale für drei rhombische [4Fe-4S]-Zentren, wobei das dritte Signal sehr schwach war. Im reduzierten FpoF-Protein fanden sich Signale für ein rhombisches und ein axiales [4Fe-4S]-Zentrum. Somit ließen sich drei vierkernige [Fe-S]-Zentren in den Inputmodulen der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen mittels EPR sicher detektieren (siehe Tab. 10). Für ein drittes Eisen-Schwefel-Zentrum spricht das Vorkommen weiterer konservierter Cysteine in der Aminosäure-Sequenz aller $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase-Inputmodule (siehe Tabelle 10 und Anhang I) und der ermittelte Gehalt an Nicht-Häm-Eisen von 14 mol pro mol Protein (siehe 3.3.1.1) bei der FqoF-Untereinheit aus *A. fulgidus*. Gegen ein drittes [4Fe-4S]-Zentrum spricht hingegen der ermittelte Gehalt an säurelabilem Schwefel von nur 7 mol pro mol Protein (siehe. 3.3.1.2), bei allen aufgereinigten F-Untereinheiten. Auch BRÜGGEMANN et al. (2000) konnte mit einem Nicht-Häm-Eisengehalt von 10,6 mol pro mol FqoF deutlich mehr Eisen ermitteln als säurelabilen Schwefel (7,2 mol/mol Protein). Hier werden noch weitere, auch potentiometrische EPR- Studien notwendig sein, um die tatsächliche Anzahl der Eisen-Schwefel-Zentren zu ermitteln.

Tabelle 10: Eigenschaften der Eisen-Schwefel-Zentren der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen aus *Methanosarcina* Spezies und *A. fulgidus*

Cluster Typ Symmetrie	Unter- einheit	EPR Signalposition (vorläufig)			[Fe-S] Bindemotive <i>Methanosarcina</i> Spezies
		gx	gy	gz	
[4Fe-4S] axial		2,015	2,015	2,03	(CxxCxxCxxxCP) ₂
[4Fe-4S] rhombisch	FpoF	1.86	1.93	2.04	PC(x) ₂₃ C(x) ₅₉ C/SxxC ?
[4Fe-4S] axial		?	?	2.066	
[4Fe-4S] [4Fe-4S]	FpoI	-			(CxxCxxCxxxCP) ₂
[4Fe-4S]]	FpoB	-			CCxxE(x) ₆₀ C(x) ₂₉ CP
[2Fe-2S] axial ? [2Fe-2S] ?	FpoO	?	?	2,035	CxxC(x) ₃₀ CxxC CxxC(x) ₂₈ CxxC

Cluster Typ Symmetrie	Unter- einheit	EPR Signalposition (vorläufig)			[Fe-S] Bindemotive <i>A. fulgidus</i>
		gx	gy	gz	
[4Fe-4S] axial		2.025	2.025	2.04	(CxxCxxCxxxCP) ₂
[4Fe-4S] rhombisch	FqoF	1.88	?	2.037	PC(x) ₂₅ C(x) ₅₉ CxxC ?
[4Fe-4S] rhombisch		1.92	?	2.023	
[4Fe-4S] [4Fe-4S] [4Fe-4S]	FqoI	-			(CxxCxxCxxxCP) ₄
[4Fe-4S]	FqoB	-			CCxxE(x) ₆₀ C(x) ₂₉ CP

Die Inputmodule der $F_{420}H_2$ Dehydrogenasen weisen die schon erwähnten Bindemotive (CxxCxxCxxxCP)₂ auf. Damit zählen sie zur Familie der sogenannten 8Fe-Ferredoxinen. Nur

eine weitere Untereinheit des Komplex I verfügt über das gleiche Bindemotiv, die Untereinheit I des membranassoziierten Moduls des Komplex I (siehe 4.2.2). Nach RASMUSSEN et al. (2001), verursachen diese Eisen-Schwefel-Zentren im UV/Vis-Redox-Differenzspektrum eine negative Absorption bei 325 und 425 nm. Auch die Ech-Hydrogenase aus *Ms. barkeri* (MEUER et al., 1999) und das 8Fe-Ferredoxins aus *C. pasteurianum* (MOULIS und MEYER, 1982) zeigten die gleiche negative Absorption im Redox-Differenzspektrum. Alle diese Proteine weisen die gleichen Bindemotive zur Koordination von zwei [4Fe-4S]-Zentren auf. Diese negative Absorption im Bereich von 325 nm konnte auch in den F Untereinheiten der F₄₂₀H₂-Dehydrogenasen aus *A. fulgidus* und *Ms. acetivorans* beobachtet werden. Jedoch wurde in diesen Fällen die Absorption stark von dem gebundenen FAD bei 370 und 450 nm dominiert (siehe 3.3.3.1 und 3.3.3.2). Dies kann als weiterer Hinweis auf das Vorhandensein von mindestens zwei [4Fe-4S]-Zentren angesehen werden.

4.2.2 Das membranassoziierte Modul

Die membranassoziierten Subkomplexe der NADH:Chinon-Oxidoreduktase und der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase stellen den verbindenden Teil des Enzyms zwischen Input-modul und membranintegrale Modul dar. Der Subkomplex aus *E. coli* setzt sich aus den Untereinheiten NuoBCDI zusammen und ist am Elektronentransfer, an der Chinonbindung und vermutlich auch an der Protonentranslokation beteiligt. EPR-Studien ergaben, dass sich in dem membranassoziierten Modul drei vierkernige Eisen-Schwefel-Zentren befinden. Die zwei [4Fe-4S]-Zentren (N6a und N6b, siehe Tab. 9) der Untereinheit NuoI konnten, wie schon erwähnt, nur durch kombinierte UV/Vis-Redox-Differenz-Spektroskopie und EPR-Spektroskopie identifiziert werden. Ihr Redox-Potential beträgt -270 mV und zeigt keine pH-Abhängigkeit (FRIEDRICH et al., 2000; RASMUSSEN et al., 2001). Unterstützt werden die Ergebnisse durch Vergleiche zwischen NuoI-homologen Proteinen, die bei allen Proteinen zwei typische Sequenzmotive (CxxCxxCxxxCP)₂ für [4Fe-4S]-Zentren erbrachten (siehe 4.2.1.2). Ein weiteres [4Fe-4S]-Zentrum mit der Bezeichnung N2 (siehe Tab. 9) ist noch nicht eindeutig lokalisiert. Es wurde jedoch ein konservierter Bereich mit vier Cysteinen in der NuoB Untereinheit identifiziert, der möglicherweise an der Bildung des [4Fe-4S]-Zentrums beteiligt ist. Zwei dieser Cysteine befinden sich jedoch in unmittelbarer Nachbarschaft, daher kommen nur drei Cysteine für die Koordination des Eisen-Schwefel-Zentrums N2 in Frage. Das vierte Cystein könnte jedoch von der NuoD-Untereinheit zur Koordination von N2 bereitgestellt werden. Das axiale Cluster N2 besitzt das höchste Redoxpotential (-220 mV) aller [Fe-S]-Zentren des Komplex I, das zudem als einziges pH-

Wert-abhängig ist. Dieses Eisen-Schwefel-Zentrum wird daher als direkter Elektronendonator für Ubichinon angesehen und mit der Protonentranslokation in Verbindung gebracht (HELLWIG et al., 2000; YANO et al., 2001).

Auch das membranassoziierte Modul der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen aus *A. fulgidus* und *Methanosarcina* ist aus den Untereinheiten B, C, D, und I aufgebaut. Wie die I Untereinheit aus *E. coli* weisen auch die FpoI bzw. FqoI Untereinheit die Bindemotive CxxCxxCxxxCP auf. Im Gegensatz zu den NuoI und FpoI Untereinheiten ist das Motiv in der Aminosäuresequenz des FqoI Proteins aus *A. fulgidus* nicht zweimal, sondern viermal vorhanden. Auch die konservierten Cysteine der NuoB Untereinheit lassen sich in den B Untereinheiten der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen wiederfinden.

Es ist bekannt, dass viele Komplex I-Inhibitoren direkt oder nahe der Ubichinon-Bindestelle angreifen. Aufgrund des hydrophoben Charakters von Ubichinon und der Inhibitoren, wurde lange Zeit die Ubichinon-Bindestelle in der NuoH-Untereinheit des stark hydrophoben, membranintegralen Moduls vermutet. Es konnte jedoch eine *Rhodobacter capsulatus* Mutante identifiziert werden, die gegen die Komplex I-Inhibitoren Piericidin und Rotenon resistent war. Diese Mutante wies eine Punktmutation auf, die zu einem Austausch eines Valin-Restes (V407) in der Untereinheit NuoD führte (DARROUZET et al., 1989). Auch konnte ein Sequenzvergleich zwischen NuoD-homologen Proteinen eine Consensus-Sequenz mit der Bezeichnung „Rich“-Motiv [aliphatisch-(X)3-H-(X)2,3-(L/T/S)] (PRIEUR et al., 2001) aufdecken. Dieses Motiv konnte in allen Ubichinon-abhängigen respiratorischen und photosynthetischen Enzymen identifiziert werden (FISHER et al., 2000). Offensichtlich ist das NuoD Protein an der Bindung des Chinons maßgeblich beteiligt. In Tabelle 11 ist das „Rich“-Motiv einiger NuoD-homologer Proteine aufgeführt.

Es wird deutlich, dass die Sequenz im Ubichinon-abhängigen Komplex I hoch konserviert ist, während sie in den Menachinon-abhängigen Enzymen aus *E. coli* (WEIDNER et al., 1993) und *T. thermophilus* (YANO et al., 1997), im Komplex I von Chloroplasten (SAZANOV et al., 1998) sowie in den FpoF/FqoF-Proteinen der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen nicht vollständig erhalten ist (DEPPENMEIER, 2002b). Während Komplex I homologe Proteine von Chloroplasten mit Plastochinon reagieren, katalysiert die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase von *Ms. mazei* Gö1 eine Methanophenazin-abhängige $F_{420}H_2$ -Oxidation. Im entsprechenden FpoD-Protein ist nur eine Aminosäure der Consensussequenz konserviert, was mit der Struktur des Elektronenakzeptors zusammenhängen könnte. Es ist wahrscheinlich, dass die Bindestelle für

Methanophenazin, im Vergleich zur Ubichinon-Bindestelle, stärker modifiziert ist, da Methanophenazin und Ubichinon strukturell sehr unterschiedlich sind.

Tabelle 11: Vergleich der Consensus-Sequenz zwischen NuoD-homologen Proteinen

Organismus	Untereinheit	Enzym	Sequenz
<i>Sinorhizobium melioli</i>	NuoD		⁵¹ PH I GYL H RG T EK
<i>Rickettsia prowazekii</i>	NuoD		³⁷ PH I G L L H RG T EK
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Nqo4		⁵⁸ PH I G L L H RG T EK
<i>Paracoccus denitrificans</i>	Nqo4	UQ	⁵⁸ PH I G L L H RG T EK
<i>Bos taurus</i> (mito)	49k		⁷⁸ PH I G L L H RG T EK
<i>Neurospora crassa</i> (mito)	49k		¹²⁶ PH V G L L H RG T EK
<i>Arabidopsis thaliana</i> (mito)	49k		⁴² PH I G S L H RG T EK
<i>Yarrowia lipolytica</i> (mito)	49k		¹¹⁴ PH V G L L H RG T EK
<i>Oryza sativa</i> (chl)	NhdH	PQ	⁴² PI L G Y L H RG M EK
<i>Arabidopsis thaliana</i> (chl)	NhdH		² PI L G Y L H RG M EK
<i>Synechocystis PCC 6803</i>	NhdH	?	⁴² PV I G Y L H RG M EK
<i>E. coli</i>	NuoD		⁵⁴ PD I G Y H H RG A EK
<i>Thermus thermophilus</i>	Nqo4		⁵⁷ PH I G Y L H T G F E K
<i>A. fulgidus</i>	FqoD	MQ	⁶⁸ PDPGY V H R S M EK
<i>Ms. mazei</i> Gö1	FpoD	Mphen	⁴¹ VEMGY I H K G I EK

(mito): Enzym im Mitochondrium lokalisiert

(chl): Enzym in der Thylakoidmembran von Chloroplasten lokalisiert

UQ: Ubichinon-abhängige Dehydrogenase

PQ: Plastochinon-abhängige Dehydrogenase

MQ: Menachinon-abhängige Dehydrogenase

Mphen: Methanophenazin-abhängige Dehydrogenase

Die Aminosäuren des Rich-Motivs sind fett gedruckt

Während der reaktive Kopf von Ubichinon aus einem aromatischen Ring besteht, besitzt der methanogene Elektronenakzeptor drei aromatische Ringsysteme und benötigt daher eine räumlich ausgedehntere Bindungsstelle, so dass in der Consensussequenz viele Aminosäuren zu finden sind, die relativ kleine Seitenketten besitzen. Der strukturelle Unterschied der Methanophenazin-Bindetasche könnte auch erklären, warum alle bisher getesteten Komplex I Inhibitoren keinen Effekt auf die Aktivität der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase zeigen (SCHMIDT, 2002). Anhand des „Rich“-Motivs können die NADH-Dehydrogenasen verschiedener Spezies in Ubichinon-abhängige Enzyme (hoch konservierte Sequenz) und in solche, die an alternative Elektronenakzeptoren gekoppelt sind (schwach konservierte Sequenz) eingeteilt werden. Jedoch ist das NuoD-Protein nicht die einzige Untereinheit, die an der Chinon-

Bindung beteiligt ist. Es wird vermutet, dass der hydrophobe Teil des Chinons von der hydrophoben Untereinheit H des membranintegralen Moduls gebunden wird (siehe Kapitel 4.2.3).

Das membranassoziierte Modul des Komplex I und eine Gruppe von membrangebundenen [Ni-Fe]-Hydrogenasen scheinen sich aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt zu haben (BÖHM et al., 1990; SAUTER et al., 1992). Es konnten Homologien sowohl zwischen den NuoD/FpoD/FqoD-Untereinheiten und der großen [Ni-Fe]-Untereinheit als auch zwischen den NuoB/FpoB/FqoB-Untereinheiten und der kleinen [Fe-S]-Untereinheit der Hydrogenasen identifiziert werden (ALBRACHT und HEDDERICH, 2000; FRIEDRICH und SCHEIDE, 2000; DUPUIS et al., 2001). Die große katalytische Untereinheit der [Ni-Fe]-Hydrogenasen besitzt am Amino-Terminus und am Carboxyl-Terminus Bindemotive mit insgesamt vier konservierten Cysteinen für die Koordination des Nickel-Eisen-Zentrums. Homologe Sequenzen lassen sich auch im C- und N-Terminus der Nuo D ähnlichen Proteine finden, jedoch weisen diese keine konservierten Cysteine auf. Die Untereinheit FpoD aus *Ms. mazei* stellt hier jedoch eine Ausnahme dar. In der FpoD Untereinheit sind noch zwei der vier Cysteine zu finden. Die kleine [Fe-S]-Untereinheit der [Ni-Fe]-Hydrogenasen besitzt hoch konservierte Bindemotive für [4Fe-4S]-Zentren. Wie aus der 3D-Struktur der periplasmatischen [Ni-Fe]-Hydrogenasen aus *Desulfovibrio gigas* hervorgeht, befindet sich das proximale [4Fe-4S]-Zentrum in direkter Nachbarschaft zu dem [Ni-Fe]-Zentrum der katalytischen Untereinheit (VOLBEDA et al., 1995). Drei dieser Cysteine, die das proximale [4Fe-4S]-Zentrum koordinieren, findet man auch in den NuoB/FpoB/FqoB-Untereinheiten wieder. Es wird vermutet, dass diese drei Cysteine an der Koordination des [4Fe-4S]-Zentrums N2 beteiligt sind (KERSCHER et al., 2001). Möglicherweise stammt das membranassoziierte Modul des Komplex I und die membrangebundene [Ni-Fe]-Hydrogenase von einer „urtümlichen“ Hydrogenase ab. Die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase könnte dabei eine Art Zwischenform darstellen.

4.2.2.1 Die FpoO Untereinheit aus *Ms.mazei* Gö1

Abweichend vom Komplex I und der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase von *A. fulgidus* befindet sich am 3'-Ende des *fpo*-Operons der *Methanosarcina*-Spezies ein Gen, das für eine zusätzliche Untereinheit mit der Bezeichnung FpoO kodiert. Diese Untereinheit weist weder auf Protein- noch auf Nukleotid-Ebene Homologien zu bekannten Proteinen auf. Es wurde daher vermutet, dass die Untereinheit FpoO eine Rolle bei der Reduktion des Methanophenazin übernimmt oder dass dieser Untereinheit eine regulatorische Funktion zukommt.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass dieses Gen für ein 16 kDa großes Protein kodiert, das mindestens ein [2Fe-2S]-Zentrum trägt (siehe 3.2.3.3). Das FpoO-Protein ist hydrophil und trägt Sequenzmotive für zwei [2Fe-2S]-Zentren. Der ermittelte Gehalt an Nicht-Häm-Eisen und säurelabilem Schwefel betrug jedoch nur 1,6 mol und 1,5 mol pro mol Protein (siehe 3.3.1.1 und 3.3.1.2). Dieses Ergebnis spricht für das Vorhandensein nur eines zweikernigen Eisen-Schwefel-Zentrums. Auch die EPR-Analyse des FpoO Proteins legt die Vermutung nahe, dass zumindest ein [2Fe-2S]-Zentrum auf der Untereinheit lokalisiert ist (siehe 3.3.5). Eine DNA-bindende Eigenschaft des FpoO Proteins konnte nicht nachgewiesen werden. Somit kann eine regulatorische Funktion der FpoO-Untereinheit auf Transkriptionsebene, zumindest für die Gene der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase, ausgeschlossen werden. Da das Vorkommen der FpoO Untereinheit auf die Gattungen *Methanosarcina* und *Methanobrevibacter* der Ordnung *Methanosarcinales* beschränkt zu sein scheint und diese Organismen als einzige methanogene Vertreter über den ungewöhnlichen Elektronenakzeptor Methanophenazin verfügen (FALINSKI, 2003), ist es denkbar, dass das FpoO Protein an der Reduktion des Methanophenazins beteiligt ist. Aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaft ist es unwahrscheinlich, dass die FpoO-Untereinheit Teil des membranintegralen Moduls ist. Geht man weiterhin davon aus, dass analog zum Komplex I auch die FpoD Untereinheit an der Bindung des Methanophenazins beteiligt und der Cluster N2 auf der Untereinheit B lokalisiert ist, so ist es wahrscheinlich, dass die O-Untereinheit im membranassoziierten Modul in räumlicher Nähe zu der FpoB und FpoD Untereinheit lokalisiert ist.

4.2.3 Das membranintegrale Modul

Der dritte Subkomplex der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase setzt sich aus den Untereinheiten NuoAHJKLMN zusammen, und wird als membranintegrales Modul bezeichnet. Das stark hydrophobe Modul verankert den Enzymkomplex in der Zellmembran und ist an der Chinonbindung und der Protonentranslokation beteiligt. Sequenzvergleiche zeigten Homologien zwischen den NuoL, M und N Untereinheiten und sekundären Na⁺/H⁺-Antiportern (FRIEDRICH et al., 1997; ITO et al., 2001; STEUBER et al., 2001). Es gibt auch hier weitreichende Homologien im Aufbau und in der Aminosäuresequenz zwischen NuoAHJKLMN und den membranintegralen Modulen der F₄₂₀H₂-Dehydrogenasen aus *Methanosarcina*-Spezies (FpoAHJKLMN) bzw. aus *A. fulgidus* (FqoAHJKLMN) (BÄUMER et al., 2000; BRÜGGEMANN et al., 2000).

An der Chinonbindung ist vermutlich auch der membranintegrale Teil beteiligt, welcher die hydrophobe Isoprenoid-Seitenkette des Ubichinons bindet. Die Bindestelle des Chinons wird eher als eine Art Bindetasche angesehen. Diese wird vermutlich von den Untereinheiten NuoD und H gebildet, wobei die Untereinheit H den hydrophoben Teil darstellt, der die Bindung des Isoprenoid-Teils des Chinons übernimmt, während die Untereinheit D für die Bindung des polaren Kopfs des Chinons zuständig ist (DARROUZET et al., 1998; KERSCHER et al., 2001; SCHULER et al., 2001). Aufgrund der großen Homologien ist anzunehmen, dass die Bindung der Elektronenakzeptoren in der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase ebenfalls an den homologen Untereinheiten FpoD/FqoD und FpoH/FqoH erfolgt.

Jedoch ist der Mechanismus des Elektronentransfers und die damit einhergehende Protonentranslokation immer noch nicht geklärt. Auch die Anzahl der Bindestellen für das Chinon wird weiterhin kontrovers diskutiert (OHNISHI, 1998; KERSCHER et al., 2001). So konnten in EPR-Studien Hinweise auf das Vorkommen von drei verschiedenen Ubichinon-Spezies (SQ_{Nf} , SQ_{Ns} und SQ_x) gefunden werden. Diese Chinon-Spezies besaßen distinkte spektroskopische und thermodynamische Eigenschaften und konnten anhand ihres unterschiedlichen Spin-Relaxations-Verhaltens als Semi-Chinon-Radikale unterschieden werden. Es wird vermutet, dass das Chinon SQ_{Nf} , welches über das schnellste Relaxations-Verhalten verfügt, in der Nähe des Eisen-Schwefel-Cluster N2 gebunden ist (OHNISHI, 1998; YANO et al., 2000). Zum anderen wurde im Komplex I von *E. coli* ein neuer Cofaktor mit der Bezeichnung „Faktor X“ identifiziert. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um eine chinoide Komponente, die posttranslational gebildet und kovalent gebunden wird. Der Faktor X könnte am Elektronentransfer von dem [Fe-S]-Zentrum N2 zum Ubichinon beteiligt sein (FRIEDRICH et al., 2000).

Es gibt Hinweise, dass sich der Mechanismus des Elektronen- und Protonentransfers in den beiden homologen Subkomplexen NuoAHJKLMN und FpoAHJKLMN unterscheidet. Zum einen wurden in methanogenen Archaea noch keine Chinone wie etwa Ubichinon oder Menachinon nachgewiesen, so dass es nicht zur Bindung der unterschiedlichen Chinon-Radikale kommen kann. Zum anderen unterscheiden sich die membranintegralen Elektronenakzeptoren der beiden Komplexe nicht nur in ihrer Struktur, sondern auch in ihrem Standard-Redoxpotential. So weist der Ubichinon-pool ein Redoxpotential von etwa 100 mV und das Methanophenazin von -250 mV auf (OHNISHI, 1998; DEPPENMEIER, 2002 b). Eine eventuell in der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase vorkommende chinoide Gruppe mit einem Redoxpotential von -80 mV, wie sie im Komplex I postuliert wird, kann so kaum in der Lage sein, Elektronen auf das Methanophenazin zu übertragen. Es ist denkbar, dass im Fall der

F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *Ms. mazei* die Untereinheit Fpo O die Aufgabe dieser chinoiden Gruppe übernimmt. Hier wäre es interessant, das Standard-Redoxpotential des [2Fe-2S]-Zentrums zu bestimmen, um abschätzen zu können ob dies thermodynamisch möglich ist. Versuche, die Redox-Eigenschaften der FpoO Untereinheit zu bestimmen, führten nicht zum Erfolg, da offensichtlich durch Sauerstoffeintrag im Zuge der Aufreinigung ein Großteil der Eisen-Schwefel-Zentren zerstört wurde (siehe 3.3.3.3). Des weiteren unterscheiden sich beide Enzyme in der Stöchiometrie der translozierten Protonen pro Elektronenpaar. Für den Komplex I wurde eine Stöchiometrie von vier translozierten Protonen pro Elektronenpaar ermittelt (GALKIN et al., 1999), dem stehen nur zwei Protonen pro Elektronenpaar in der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase von *Ms. mazei* Gö1 (BÄUMER et al., 2000) gegenüber. Das homologe Enzym aus *A. fulgidus* ist dahingehend noch nicht untersucht worden, es wird aber auch von einer Stöchiometrie von 2 Protonen pro Elektronenpaar ausgegangen.

Mangels einer 3D-Struktur des Komplex I, kann bislang über den Mechanismus der Protonentranslokation nur spekuliert werden. Eine Grundvoraussetzung zur Lösung der Struktur bzw. zur Charakterisierung des Komplex I ist das Vorhandensein einer ausreichenden Menge an homogenem Enzym. Daher sollen im Folgenden einige Methoden der Überproduktion und Aufreinigung des Komplex I bzw. seiner Untereinheiten vorgestellt und mit den in dieser Arbeit durchgeführten Methoden verglichen werden.

4.3 Betrachtungen zur Überproduktion und Aufreinigung von Untereinheiten des Komplex I und der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase

Die Aufreinigung und Charakterisierung des Komplex I der Atmungskette stellt aufgrund seiner enormen Größe, seines komplexen Aufbaus und seiner großen Anzahl an prosthetischen Gruppen eine besondere Herausforderung dar. So besteht der mitochondriale Komplex I der Säuger aus bis zu 45 verschiedenen Untereinheiten, mit einer molekularen Masse von fast 1000 kDa. Von diesen 45 Untereinheiten haben 14 Untereinheiten ein Gegenstück in der prokaryotischen NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (NDH I). Die Funktion der übrigen Untereinheiten ist weitgehend unbekannt. Die als Minimal-Komplex I angesehene NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase der Prokaryonten besteht aus bis zu 14 Untereinheiten und weist immer noch eine Gesamtgröße von etwa 500 kDa auf. Dieser Minimal-Komplex besitzt alle katalytischen Untereinheiten und prosthetischen Gruppen des mitochondrialen Komplex I und wird als optimales Modell zur Aufklärung der Struktur und der Funktion des Komplex I angesehen. Ebenso kann die in dieser Arbeit analysierte F₄₂₀H₂-Dehydrogenase als Minimal-

Komplex I der *Archaea* angesehen werden, da auch dieser Komplex über alle notwendigen katalytischen Untereinheiten und prosthetischen Gruppen verfügt und lediglich das Inputmodul an einen anderen Elektronendonator angepasst ist.

Von mehreren Arbeitsgruppen wurde die Isolierung des Komplex I aus der Cytoplasmamembran der Prokaryonten bzw. aus der mitochondrialen Membran der Eukaryonten beschrieben (LEIF et al., 1995; KREBS et al., 1999; KASHANI-POOR et al., 2001; PENG et al., 2003). Allen Methoden ist die Solubilisation der Membran mit einem geeigneten Detergenz gemeinsam, (meist 2 - 5% w/v Octyl-Glucosid oder Dodecyl-Maltosid), um so den Komplex inklusive des hydrophoben membranintegralen Moduls aus der Membran zu lösen. Meist schließt sich eine Chromatographie mit einem starken Anionenaustauscher (Mono Q oder Source Q) und eine damit verbundene Senkung des Detergenzgehaltes auf 0,05 - 0,15 % an. Nach der Aufreinigung ist eine sogenannte Rekonstitution des Komplexes in einer künstlichen Membran mittels Proteoliposomen notwendig. Hierzu wird der Komplex bei einem definierten pH-Wert in Soja-Bohnen-Lipid (Asolectin) aufgenommen. Die so erhaltenen Ausbeuten sind, gemessen an dem doch immensen Aufwand, eher gering. Ziel vieler Arbeitsgruppen ist es daher, die Ausbeute zu maximieren und den Arbeitsaufwand zu minimieren, um so die für die Kristallisationsstudien zur Lösung der 3D-Struktur notwendigen Mengen von hochreinem Enzym zu erhalten. So wurde von der Arbeitsgruppe um Ulrich Brandt eine Ein-Schritt-Aufreinigung des Komplex I aus der Hefe *Yarrowia lipolytica* beschrieben (KASHANI-POOR et al., 2001). Hierzu wurde das chromosomale Gen *nugM* (*nuoC*-Homolog) deletiert und dann mittels einer *nugM* Kopie, welche eine angefügte Sequenz für einen Alanin-Linker und einen Histidin-Tag aufwies, komplementiert. Dieser His-Tag ermöglichte eine Aufreinigung des aktiven Gesamt-Komplexes mittels einer Nickel-NTA Affinitäts-Chromatographie in nur einem Reinigungsschritt. Mit dieser Methode konnten aus 10 Litern Zellkultur bis zu 76 mg gereinigtes Enzym gewonnen werden. Eine weitere Möglichkeit die Effizienz zu erhöhen, stellt die Verwendung eines starken induzierbaren Promotors dar. Diese Methode wurde von der Gruppe um Thorsten Friedrich bei der Überexpression des bakteriellen Komplex I von *E.coli* angewandt (SPEHR et al., 1999). In diesem Fall wurde der Promotor des *nuo*-Operons durch den RNA Polymerase-Promotor des Phagen T7 (T7-Promotor) ersetzt. Die zur Transkription des *nuo*-Operon notwendige T7-RNA-Polymerase wurde von einem Plasmid mit IPTG induzierbaren *lac* UV5-Promotor bereitgestellt. So konnte die Expression des Komplex I um den Faktor vier gesteigert werden. Aus 10 Litern *E. coli* Zellkultur konnten mit dieser Methode 5,4 mg gereinigter Komplex I gewonnen werden. Auch für die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase wurden

Methoden zur Aufreinigung des Gesamt-Komplexes beschrieben (HAASE et al., 1992; KUNOW et al., 1994; ABKEN und DEPPENMEIER, 1997). Alle beschriebenen Methoden führten jedoch lediglich zur Aufreinigung von einzelnen Untereinheiten oder Subkomplexen (siehe 4.1.4.3). So war im Besonderen der membranintegrale Teil, bestehend aus den hydrophoben Untereinheiten Fpo/Fqo H, A, J, K, L, M und N einer Aufreinigung nicht zugänglich. Zudem führte die Aufreinigung oft zum Verlust prosthetischer Gruppen. Auch aufgrund der geringen Zelldichten von *A. fulgidus*- und *Methanosarcina*-Spezies-Kulturen erschien eine Isolierung des Gesamt-Komplexes zur Lösung der 3D-Struktur aus diesen Organismen nicht sinnvoll. So konnten aus 100 Liter *Ms. mazei* Zellkultur lediglich 0,1 mg F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aufgereinigt werden, die zudem lediglich aus den Untereinheiten FpoB, C, D, I und F bestand (ABKEN und DEPPENMEIER, 1997). Aus diesem Grund wurde dazu übergegangen, einzelne Untereinheiten der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase mittels geeigneter Expressionssysteme heterolog in *E. coli* überzuproduzieren (siehe Kapitel 3.2). Erstmals wurde dies von BRÜGGEMANN et al. (2000) erfolgreich für die FqoF Untereinheit aus *A. fulgidus* durchgeführt. Die FqoF Untereinheit wurde mit Hilfe des pET-Systems (T7-Promotor) in *E. coli* BL21(DE3) überproduziert und mittels einer Hitzebehandlung und anschließender Chromatographie an Hydroxylapatit aufgereinigt. Die als Inputmodul fungierende Untereinheit wies alle vorausgesagten prosthetischen Gruppen (FAD und [Fe-S]-Zentren) auf und konnte in hohen Raten F₄₂₀H₂ oxidieren. Aus 10 Litern Zellkultur konnte so von BRÜGGEMANN et al. (2000) 6 mg gereinigtes FqoF isoliert werden. In dieser Arbeit konnte die Ausbeute durch eine „in frame“ Klonierung des *fqoF*-Gens in den Vektor pET21c (siehe 3.1.1.3. und Kapitel 3.2.1.) auf 37 mg pro 10 Liter Zellkultur gesteigert werden. Auch die Ausbeuten der erstmals in dieser Arbeit heterolog überproduzierten Untereinheiten FpoF aus *Ms. acetivorans* und FpoO aus *Ms. mazei* GöI lagen mit 15 und 12 mg je 10 Liter Zellkultur in dem für eine Kristallisation notwendigen Rahmen (siehe 3.2.2.4 und 3.2.3.2). Die Untereinheiten wiesen außerdem die aus der Primärsequenz vorausgesagten prosthetischen Gruppen auf (siehe 3.3.1.1 und 3.3.1.2). Das FpoF Protein zeigte zudem eine F₄₂₀H₂-Dehydrogenase-Aktivität von 10 U/mg. Die beiden zuletzt genannten Untereinheiten wurden mittels eines angefügten Strep-Tag und einer Affinitäts-Chromatographie an Strep-Tactin aufgereinigt. Das Strep-Tag Expressions-System der Firma IBA Göttingen ermöglichte eine besonders schnelle und effiziente Aufreinigung der Untereinheiten in nur einem Aufreinigungsschritt (siehe 3.2.2.2 und 3.2.3.2).

Da die Kristallisationsstudien mit dem Gesamt-Komplex I bisher nicht zum Erfolg führten, gehen immer mehr Arbeitsgruppen zu einer Überproduktion von einzelnen Untereinheiten

bzw. von Subkomplexen über. Auch für das Inputmodul der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase, dem sogenannten NADH-Dehydrogenase-Fragment, aus *E. coli* wurde eine Aufreinigung mit Hilfe eines Strep-Tag Fusionsproteins beschrieben (BUNGERT et al., 1999). Jedoch ergab sich, dass das Inputmodul bestehend aus den Untereinheiten NuoE, F und G nur bei einer gleichzeitigen Expression der Untereinheiten B und CD korrekt assembliert wurde. In diesem Fall konnten aus 30 g Zellen 18 mg aktives NADH-Dehydrogenase-Fragment aufgereinigt werden. Die Arbeitsgruppen um Takao Yagi und Takahiro Yano verfolgen die Strategie der heterologen Überproduktion einzelner Untereinheiten des Komplex I in *E. coli*. Der verwendete Modell-Organismus ist in diesem Fall *Paracoccus denitrificans*. Da die 3D-Struktur des Komplex IV, der Cytochrom *c* Oxidase, aus diesem Organismus gelöst werden konnte (MICHEL et al., 1998), erhofft man sich ähnliches auch vom Komplex I aus diesem Organismus. Schon 1995 konnten die Untereinheiten NQO1 und NQO2 (NuoF und NuoE Homologe) zusammen in *E. coli* heterolog überproduziert werden (YANO et al., 1996). Die Aufreinigung geschah mit Hilfe eines N-terminalen His-Tags an der NQO1 Untereinheit. Jedoch stellte sich heraus, dass die so heterolog überproduzierten Untereinheiten kein FMN und keine [4Fe-4S]-Zentren enthielten. Diese mussten erst durch eine umständliche Prozedur rekonstituiert werden. Es zeigte sich außerdem, dass die NQO1 (NuoF) Untereinheit, wurde sie alleine in *E. coli* überproduziert, Proteineinschluss-Körper, sogenannte „Inclusion-Bodys“ bildete und einer Aufreinigung nicht zugänglich war. Ähnliches konnte bei der heterologen Überproduktion der NQO9 Untereinheit (NuoI Homolog) beobachtet werden (YANO et al., 1999). Diese Untereinheit trägt die zwei [4Fe-4S]-Zentren N6a/b, die bei der heterolog in *E. coli* aufgereinigten *Paracoccus*-Untereinheit nicht vollständig vorhanden waren und ebenfalls durch eine Rekonstitution wieder eingefügt werden mussten.

Mit den in dieser Arbeit aufgereinigten Inputmodulen der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *A. fulgidus* und *Ms. acetivorans* stehen zwei aktive Proteine aus einem hyperthermophilen und einem mesophilen Organismus für Kristallisations-experimente zur Verfügung. Die Proteine können in großer Menge in löslicher Form produziert werden. Die bis zur Homogenität aufgereinigten Proteine verfügen über alle notwendigen prosthetischen Gruppen, die nicht erst durch aufwendige Rekonstitution wiederhergestellt werden müssen. Da die Inputmodule der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase lediglich aus einer Untereinheit bestehen, kann es auch nicht zu Problemen bei der Assemblierung des Moduls, wie sie bei der Überproduktion des Inputmoduls aus *E. coli* beschrieben wurden (BUNGERT et al., 1999), kommen. Somit sind die Grundvoraussetzungen für eine erfolgreiche Kristallisation erfüllt. Erste

Kristallisationsversuche zeigten, dass diese Proteine einer Kristallisation zugänglich sind (siehe Kapitel 3.4). Wenn auch die erhaltenen Kristalle nicht die zur Ermittlung der 3D-Struktur notwendige Streuung aufwiesen, so ist dies jedoch als ein wichtiger erster Schritt zur Lösung der Struktur des Elektronen-einspeisenden Moduls der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase anzusehen. Diese Struktur könnte auch zur Aufklärung der Funktion des Inputmoduls des Komplex I beitragen. Wie schon mehrfach erwähnt, gibt es noch keine hochauflösende 3D-Struktur des Komplex I, jedoch hat man anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen recht genaue Vorstellungen über die strukturelle Organisation des Komplex I in der Membran. Diese sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

4.4 3D-Modelle des Komplex I / NDH I

In den letzten 15 Jahren wurden verschiedene 3D-Modelle für den Komplex I entwickelt. Abbildung 68 zeigt 3D-Modelle wie sie anhand von elektronen-mikroskopischen Aufnahmen entwickelt wurden. Alle Modelle schlagen eine L-förmige Struktur des Komplexes vor. Das L-förmige Modell besteht aus zwei Segmenten. Die periphere Domäne ragt in die Matrix der inneren Membran der Mitochondrien bzw. in das Cytoplasma der Bakterien, während der größte Teil der Membran-Domäne in der inneren mitochondrialen Membran bzw. in der Cytoplasmamembran der Bakterien integriert ist. Kürzlich postulierte die Arbeitsgruppe um Thorsten Friedrich, dass der Komplex I aus *E. coli* in seiner aktiven Form eine Hufeisenförmige Struktur aufweist und dass die L-förmige Struktur lediglich die inaktive Form des Komplex I darstellt (siehe 7. und 8. Abb. 68; BÖTTCHER et al., 2002). Jedoch konnten diese Beobachtungen von anderen Arbeitsgruppen, die mit dem gleichen Organismus arbeiteten, nicht bestätigt werden (SAZANOV, 2002). Trotzdem besteht die Möglichkeit, dass diese beobachteten unterschiedlichen Strukturen auf eine Konformationsänderung im Komplex I während der Katalyse hinweisen (YAGI und YAGI, 2003). Diese 3D-Modelle geben lediglich einen Einblick in die strukturelle Organisation des Komplexes in der Membran. Für eine Aussage über die Funktion und den Mechanismus des Elektronentransfers und der Protonentranslokation ist jedoch eine hochauflösende 3D-Struktur notwendig. Nur so lassen sich die verschiedenen redox-aktiven Gruppen den einzelnen Untereinheiten exakt zuordnen und nur so lässt sich eine Aussage darüber machen, wie der Elektronentransfer über die verschiedenen Eisen-Schwefel-Zentren mit der Protonentranslokation gekoppelt ist.

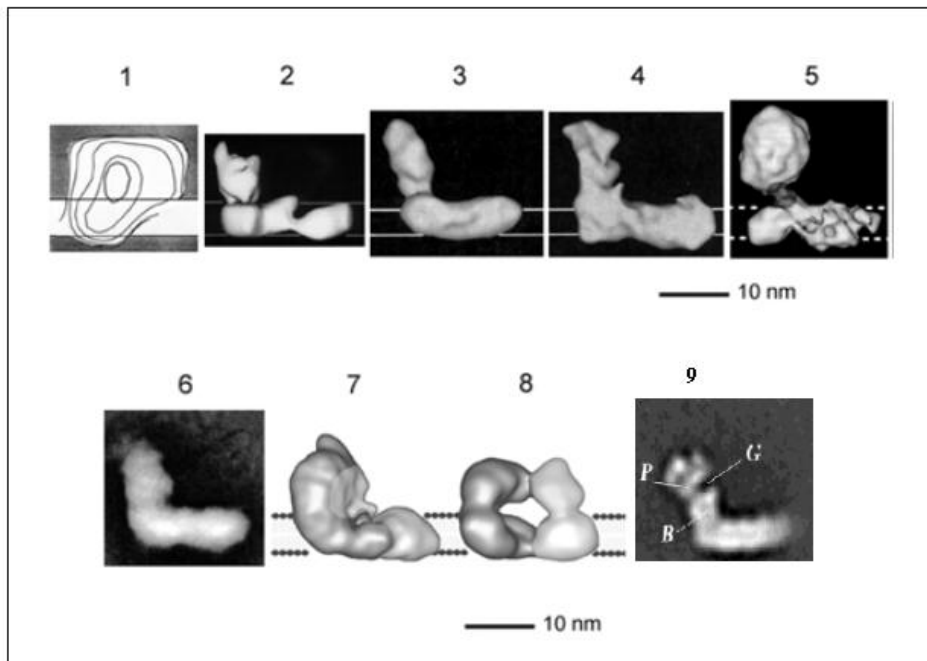


Abb. 68: Vergleich der 3D-Modelle des Komplex I/NDH1 (EM-Analysen)
(aus YAGI und YAGI, 2003; PENG et al., 2003)

1. *N. crassa* (LEONARD et al., 1987)
2. *N. crassa* (HOFHAUS et al., 1991)
3. *N. crassa* (GUENEBAUT et al., 1997)
4. *E. coli NDH-1* (GUENEBAUT et al., 1998)
5. Bovine heart (GRIGORIEFF, 1998)
6. *Y. lipolytica* DJAFARZADEHA et al., 2000)
7. *E. coli* (BÖTTCHER et al., 2002); "inaktive" Form
8. *E. coli* (BÖTTCHER et al., 2002); "aktive" Form
9. *Aquifex aeolicus* (PENG et al., 2003)

4.5 Kristallisation der Inputmodule F₄₂₀H₂-Dehydrogenase

Bisher wurde noch von keiner Arbeitsgruppe über eine erfolgreiche Kristallisation des Komplex I oder dessen Untereinheiten berichtet. In dieser Arbeit wurden die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Kristallisation der Inputmodule der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *A. fulgidus* und *Ms. acetivorans* geschaffen (siehe Kapitel 4.3). Weiterhin konnten beide Untereinheiten kristallisiert werden (siehe 3.4.1 und 3.4.2). Zwar wiesen die Kristalle noch nicht die erforderliche Streuung im Röntgenstrahl auf, jedoch sollte es durch weitere Kristallisationsexperimente möglich sein, in absehbarer Zeit, geeignete Kristalle zu erzeugen. Da inzwischen die, für eine anaerobe Kristallisation notwendigen anaeroben Kristallisationskammern am Institut für Molekulare Strukturbiologie, Göttingen, zur Verfügung stehen, können die Kristallisationsexperimente nun auch anaerob durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit die Eigenschaften der Kristalle zu verbessern, könnte eine strikt anaerobe Aufreinigung darstellen. So konnte die Adenylylsulfat-Reduktase aus *A. fulgidus*, welche ebenfalls ein FAD und zwei vierkernige Eisen-Schwefel-Zentren aufweist, nur aus anaerob aufgereinigtem Enzym kristallisiert werden (ROTH et al., 2000).

Die 3D-Struktur der Inputmodule der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase könnte entscheidende Hinweise auf den Ablauf des Elektronentransfers vom Substrat, dem F₄₂₀H₂, über das kovalent gebundene FAD auf die [4Fe-4S]-Zentren geben. Diese Erkenntnisse könnten auch zur Klärung des Elektronentransfers durch das Inputmodul des Komplex I beitragen und somit helfen, den Mechanismus des Komplex I besser zu verstehen.

4.6 Der Reaktionsmechanismus des Komplex I und der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase

Der Komplex I katalysiert den Elektronentransport von NADH auf den Chinon-Pool. Dieser Elektronentransport ist mit einer Protonentranslokation über die innere mitochondriale Membran bzw. über die Cytoplasmamembran der Prokaryonten gekoppelt. Da der genaue Reaktionsmechanismus nicht bekannt ist, wurden verschiedene hypothetische Modelle des Reaktionsmechanismus entwickelt. Diese Modelle müssen kompatibel mit den bisherigen Erkenntnissen über den Komplex I sein. Hilfreich können auch Vergleiche mit Komplex I ähnlichen Enzymen wie etwa der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase der *Archaea* sein. Die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase weist drei wesentliche Unterschiede zu der als Minimal-Komplex I angesehenen NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase aus *E. coli* auf. Das Inputmodul der F₄₂₀H₂-Dehydrogenasen besteht nicht aus drei, sondern nur aus einer Untereinheit und ist an die

Nutzung des $F_{420}H_2$ als Elektronendonator angepasst. Der Komplex der methanogenen Organismen nutzt keine Chinone als Elektronenakzeptoren, sondern Methanophenazin. Daher wird vermutet, dass die nur in diesen Organismen vorkommende zusätzliche Untereinheit FpoO an der Reduktion des Methanophenazins beteiligt ist. Des Weiteren werden von der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase pro transferiertem Elektronenpaar nur zwei Protonen über die Cytoplasmamembran transloziert, während der Komplex I mit vier Protonen pro $2e^-$ eine doppelt so große Effizienz aufweist. Im Folgenden soll daher der mögliche Reaktionsmechanismus anhand der hypothetischen Modelle des Komplex I diskutiert werden.

4.6.1 Betrachtungen zum Reaktionsmechanismus der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase

Die vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen für die Protonentranslokation des Komplex I können prinzipiell in zwei unterschiedliche Arten eingeteilt werden. Zum einen gibt es Modelle, die eine direkte, redox-getriebene Protonenpumpe vorschlagen und zum anderen gibt es Modelle, die eine indirekte, durch Konformationsänderung getriebene Protonentranslokation propagieren. Allen gemeinsam ist die Annahme, dass das Eisen-Schwefel-Zentrum N2 mit dem höchsten und pH-abhängigen Redoxpotential direkt an der Reduktion des Chinons beteiligt ist. Das erste Modell, die sogenannte direkte Kopplung, setzt voraus, dass die im membranintegralen Modul des Komplex I enthaltenen Elektronenüberträger, die Chinone, direkt an der Protonentranslokation beteiligt sind. Stark vereinfacht müssten die Chinone durch Reduktion auf der einen Seite der Membran Protonen aufnehmen und sie an der anderen Seite der Membran durch Reoxidation wieder entlassen. Ein Beispiel für eine solche direkte Kopplung stellt die Cytochrom *c* Oxidase der Atmungskette dar (MICHEL, 1999).

Der von BRANDT (1997) und DUTTON et al. (1998) vorgeschlagene „Reduktionsmittel induzierte Oxidationsmechanismus“, propagiert ebenfalls eine direkte Kopplung. Er stellt jedoch eine erweiterte Form des Q-Zyklus (MITCHELL, 1976) dar und lehnt sich an den Reaktionsmechanismus der Energiekonservierung des Cytochrom *bc₁*-Komplex der Atmungskette an. Dieser Mechanismus setzt drei Ubichinon-Bindestellen im Komplex I der Mitochondrien voraus. Die Bindestellen Q_{nz} und Q_{ny} können Ubichinon bzw. Dihydro-Ubichinon mit dem Membran-Pool (Q_{pool}) austauschen, während die dritte (Q_{nx}) zwischen den beiden ersten lokalisiert sein soll, welche ihre Konformation ändern kann, je nachdem, ob ein Semichinon oder Dihydrochinon gebunden ist. Die Q_{nz} -Bindestelle hat Zugang zu den

Protonen der Matrix-Seite, während die Q_{ny} -Bindestelle, die Protonen des Intermembranraumes nutzt. Ein Reaktionszyklus besteht demnach aus folgenden Schritten:

Die Elektronen des NADH werden auf das Flavin des Inputmoduls übertragen und gelangen von dort über die verschiedenen [Fe-S]-Zentren zu dem Eisen-Schwefel-Zentrum N2 des membranassoziierten Moduls. Dieses Zentrum besitzt das höchste Redox-Potential aller [Fe-S]-Gruppen des Komplex I, das zudem noch pH-Wert abhängig ist. Weiterhin soll das Cluster N2 nahe der Schnittstelle zwischen Matrix und Membran lokalisiert sein. Ein aus dem Chinon-Pool (Q_{Pool}) stammendes Ubichinon, das sich an der Q_{nz} -Bindestelle befindet, erhält ein Elektron vom [Fe-S]-Zentrum N2. Es entsteht in einer endergonen Reaktion ein instabiles Semichinon. An der Q_{ny} -Bindestelle ist ein Dihydro-Ubichinon gebunden, dass in einer exergonen Reaktion durch das Semichinon oxidiert wird. Dadurch wird das instabile Semichinon zum stabilen Dihydro-Ubichinon reduziert, was mit der Bindung zweier von der mitochondrialen Matrix stammenden Protonen einhergeht. Da das Dihydro-Ubichinon in der Q_{ny} -Bindestelle zu einem Semichinon oxidiert wurde, werden zwei Protonen durch einen Kanal in den Intermembranraum freigesetzt. Die Oxidation führt außerdem zu einer Konformationsänderung an der Q_{ny} -Bindestelle. Das nun an der Q_{ny} -Bindestelle gebundene Semichinon bewirkt eine Konformationsänderung, die es der Q_{ny} -Bindestelle ermöglicht, Zugang zu den Protonen der Matrix-Seite zu erhalten. In Anwesenheit von Dihydro-Ubichinon war der Zugang zu cytoplasmatischen Protonen gegeben. Durch die geänderte Konformation kann nun ein Dihydro-Ubichinon, das sich an der Q_{nx} -Bindestelle befindet, das Semichinon in der Q_{ny} -Bindestelle zum Dihydro-Ubichinon zurück reduzieren. Wiederum werden ein oder zwei Protonen gebunden. Die Protonen gelangen über einen in die Matrix-Seite mündenden Kanal zu der Q_{ny} -Bindestelle. Gleichzeitig werden ein oder zwei Protonen von dem an der Q_{nx} -Bindestelle gebundenen Dihydro-Ubichinon in den mitochondrialen Intermembranraum freigesetzt. Dadurch wird die ursprüngliche Konformation der Q_{ny} -Bindestelle wieder hergestellt. Nun kann Q_{nz} im Q_{Pool} Dihydro-Ubichinon gegen Ubichinon austauschen und einen neuen Reaktionszyklus einleiten, bei dem wiederum pro zwei transportierten Elektronen vier bis sechs Protonen über die Membran transloziert werden.

Die zweite Art Modell, die indirekte Kopplung, setzt voraus, dass das katalytische Zentrum, welches die Elektronen auf das Chinon überträgt und die Protonenpumpe zwei von einander getrennte Einheiten sind. Der Energietransfer erfolgt dann über eine Kopplung dieser beiden Bereiche, die eine Änderung der Konformation bewirkt. Ein prominentes Beispiel für eine

solche indirekte Kopplung stellt die ATP-Synthase dar (SAMBONGI et al., 1999). In den letzten Jahren wurden vermehrt Hinweise gefunden, die eher für den letztgenannten Mechanismus der Protonentranslokation durch den Komplex I sprechen (YAGI und YAGI, 2003; BRANDT et al., 2003). So spricht der Aufbau des Komplex I eher für eine indirekte Kopplung. Da sich alle Eisen-Schwefel-Zentren und das Flavin im peripheren Bereich befinden, bliebe allein das Chinon als Elektronenüberträger im membranintegralen Modul und wäre sowohl für die Elektronenübertragung als auch für die Protonentranslokation zuständig. Es ist eher unwahrscheinlich, dass das Chinon beide Rollen übernimmt, da bei den anderen beiden direkten Protonenpumpen der Atmungskette dem bc_1 -Komplex und der Cytochrom-*c*-Oxidase Häm-Gruppen im Membran-Teil dieser Enzyme vorkommen. Auch konnte anhand von Inhibitor-Studien gezeigt werden, dass es sich bei der Bindestelle des Chinons eher um eine große, unspezifische Bindetasche handelt (OKUN et al., 1999). Dieser Befund spricht gegen drei definierte Bindestellen, wie sie der „Reduktionsmittel induzierte Oxidationsmechanismus“ voraussetzt. Desweiteren ist der Komplex I ein reversibles Enzym, da er sowohl die NADH-Q Reduktase Reaktion (vorwärts) als auch die QH_2 -NAD-Reduktase Reaktion (rückwärts) katalysieren kann. Außerdem wurden Hinweise gefunden die dafür sprechen, dass der Komplex I auch in der Lage ist Natrium-Ionen zu pumpen (GEMPERLI et al., 2002). Bisher gibt es keine Hinweise, dass auch die direkten Pumpen, der bc_1 -Komplex und die Cytochrom-*c*-Oxidase Natrium-Ionen translozieren. Zudem katalysieren beide Proteine nur die Vorwärts-Reaktion und sind nicht reversibel. Die konformationsgetriebene ATP-Synthase hingegen ist ebenfalls ein reversibles Enzym und ist auch in der Lage, Natrium-Ionen zu translozieren (DIMROTH et al., 1999). Diese Fakten sprechen eher für eine indirekte, durch Konformationsänderung getriebene Protonentranslokation durch den Komplex I.

Das von FRIEDRICH (2001) vorgeschlagene Modell ist eine Kombination der beiden zuvor beschriebenen Modelle (mixed model) und basiert auf der Annahme, dass der Komplex I bedingt durch die sogenannte modulare Evolution zwei Kopplungsstellen zur Protonentranslokation beinhaltet, wovon eine redox-getrieben- (Hydrogenasemodul) und die andere konformationsgetrieben (Transportermodul) sein soll. Nach der Theorie der modularen Evolution des Komplex I (FRIEDRICH und WEISS, 1997) besteht der Komplex I aus Modulen, deren Vorläufer in heutigen Enzymen bzw. Enzym-Komplexen zu finden sind. Danach ist der Komplex aus einem im Cytoplasma lokalisierten NADH-Dehydrogenase-Modul, einem amphipatischen Hydrogenase-Modul und einem membrangebundenen

Transporter-Modul aufgebaut. Das NADH-Dehydrogenase-Modul weist Homologien zu heutigen NAD-abhängigen, löslichen Hydrogenasen auf, während das Hydrogenase-Modul (NuoB,C,D,I und H) Ähnlichkeiten zu membrangebundenen Hydrogenasen wie der Ech-Hydrogenase aus *Ms. barkeri* aufweist (FRIEDRICH, 2001; BRANDT et al., 2003). Die Proteine NuoA, J, K, M und N zeigen Homologien zu komplexen Antiporthern und werden daher als Transportermodul bezeichnet (FRIEDRICH und SCHEIDE, 2000; siehe auch Kapitel 4.2). Die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase verfügt ebenso wie der Komplex I über das Hydrogenase- und das Transporter-Modul. Lediglich das Inputmodul ist an die Nutzung des $F_{420}H_2$ angepasst. Vor dem Hintergrund der vorgestellten Modelle soll nun der mögliche Reaktions-Mechanismus der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase diskutiert werden.

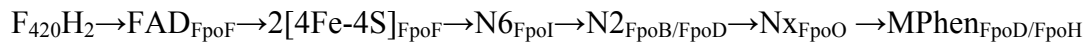
4.6.2 Betrachtungen zum möglichen Reaktionsmechanismus der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase

Eine zentrale Frage die sich für den Reaktionsmechanismus der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase stellt, ist die nach der Ursache der verminderten Effizienz der Protonentranslokation. So konnten BÄUMER et al. (2000) zeigen, dass beim Elektronentransport durch die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase aus *Ms. mazei* nur zwei Protonen pro oxidiertem $F_{420}H_2$ über die Membran transloziert werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der zur Verfügung stehenden freien Energie von nur $-20,2$ kJ/mol durch das Redoxpaar $F_{420}H_2$ /Methanophenazin ($E_0' = -360$ mV/-250 mV). GALKIN et al. (1999) ermittelten hingegen eine Translokation von vier Protonen je oxidiertem NADH ($NAD^+ E_0' = -320$ mV) im Komplex I. Dieser Wert für die NADH-abhängige Ubichinon-Reduktion wurde an Membran-Vesikeln von Mitochondrien unter Verwendung eines Ubichinon-Homologs ermittelt ($\Delta G = -80,9$ kJ/mol). Eine bemerkenswerte Eigenschaft des Komplex I ist seine Fähigkeit die Reduktion verschiedener Chinone, welche über verschiedene Standard-Redoxpotentiale verfügen, zu katalysieren. So weist das Menachinon (MQ) der fakultativ anaeroben Bakterien ein Potential von -80 mV, das Plastochinon (PQ) der Chloroplasten ein Potential von $+80$ mV und der Ubichinon-Pool (UQ) der Mitochondrien ein Standard-Redoxpotential von $+110$ mV auf. Somit ist der ΔE -Wert zwischen NADH und MQ mit -240 mV wesentlich geringer als bei der Nutzung des NADH/UQ Redoxpaares (-450 mV). Für anaerob gewachsene *E. coli* Zellen (Nutzung von MQ) konnten BOGACHEV et al. (1996) lediglich eine $H^+/2e^-$ Stöchiometrie von 3 ermitteln. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die $H^+/2e^-$ Stöchiometrie des Komplex I in Organismen zu ermitteln, die ausschließlich Menachinon verwenden, wie etwa *Thermus* Spezies. Diese große Spannweite der ΔE -Werte wirft die Frage auf, ob tatsächlich weniger

Protonen bei der Verwendung von Menachinon anstelle von Ubichinon gepumpt werden und ob die Leistung der Protonenpumpe generell abhängig von dem genutzten Elektronenakzeptor bzw. von der zur Verfügung stehenden freien Gibbs Energie ist. Wenn dies der Fall wäre, könnte sich so die verminderte Effizienz der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase aus *Ms. mazei* erklären. Die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase aus *A. fulgidus* nutzt hingegen Menachinon. In diesem Fall ist der ΔE -Wert zwischen $F_{420}H_2$ und MQ größer als bei dem Enzym aus *Ms. mazei*, das die Elektronen von $F_{420}H_2$ auf Methanophenazin transferiert. Auch in diesem Fall wäre es interessant die $H^+/2e^-$ Stöchiometrie zu ermitteln. Studien mit Komplex I Inhibitoren zeigten keinen Effekt auf die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen, weder auf die aus *Ms. mazei* noch auf die aus *A. fulgidus* (SCHMIDT, 2002). Trotz der Verwendung von MQ durch die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase aus *A. fulgidus*, muss daher davon ausgegangen werden, dass sich auch hier die Chinon-Bindetasche von der des Komplex I unterscheidet. Da die strukturellen Unterschiede der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen lediglich durch die Nutzung andersartiger Elektronendonatoren und Akzeptoren begründet sind, könnte der Mechanismus der Protonentranslokation dem des Komplex I ähnlich sein. Der mögliche Reaktionsmechanismus der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase stellt sich demnach wie folgt dar:

Das reduzierte F_{420} dient dem Enzym als Elektronendonator. Als Inputmodul des Enzyms fungiert die F Untereinheit, welche den Elektronendonator oxidiert und die Elektronen zu dem membranassoziierten Modul weiterleitet. Das membran-assoziierte Modul ist aus den Untereinheiten FpoBCDI/FqoBCDI aufgebaut, die sehr hohe Homologien zu den korrespondierenden Untereinheiten des Komplex I zeigen. Dieses Modul verfügt über sämtliche Bindemotive für die Eisen-Schwefel-Zentren N6a/b und N2, so dass prinzipiell der Elektronentransfer bis zu dem Cluster N2 auf dem gleichen Weg wie im Komplex I ablaufen könnte. Änderungen in der Struktur von FpoD/FqoD im Vergleich zur entsprechenden Untereinheit im Komplex I (NuoD) sind wahrscheinlich, da zum einen der hydrophile Teil des Methanophenazins in *Ms. mazei* die Aufgabe des Chinons des Komplex I übernimmt und zum anderen beide Enzyme aus *A. fulgidus* und *Ms. mazei* nicht durch Komplex I Inhibitoren, die an der Chinon-Bindetasche angreifen, hemmbar sind. So ist es wahrscheinlich, dass sich der weitere Elektronentransfer auf die membranintegralen Elektronenüberträger und die damit verbundene Protonentranslokation mechanistisch von der des Komplex I unterscheidet. Als eine Besonderheit ist die Untereinheit FpoO anzusehen, deren korrespondierendes Gen am Ende des *fpo*-Operons von *Ms. mazei* lokalisiert ist und kein homologes Gegenstück im Komplex I hat (siehe Abb. 65 und Kapitel 4.2.2.1). Da das Protein Motive für zwei [2Fe-2S]-Zentren aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass die O-Untereinheit an der Reduktion des

Methanophenazins beteiligt ist. Ein möglicher Elektronentransport durch den *Ms. mazei* Komplex könnte nach DEPPENMEIER (2002 b) wie folgt ablaufen:



Auf gleiche Weise könnte der Elektronentransport durch den Komplex aus *A. fulgidus* ablaufen, jedoch mit dem Unterschied, dass in diesem Fall keine O-Untereinheit existiert, da ein Menachinon als Elektronenakzeptor fungiert. Nach der Reduktion des Eisen-Schwefel-Zentrums N2 stellt sich die Frage, wie der weitere Elektronentransfer auf die membranintegralen Elektronenakzeptoren, das Mena-chinon und das Methanophenazin, mit der Protonentranslokation gekoppelt ist. Das Modell des „Reduktionsmittel induzierten Oxidationsmechanismus“ ist auch für die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase eher unwahrscheinlich. Nach diesem Modell müssten drei definierte Bindestellen für das Methanophenazin im *Ms. mazei* Komplex existieren. Das Methanophenazin müsste weiterhin stabile Radikale bilden können. Dies gilt als eher unwahrscheinlich, da zum einen der hydrophile Kopf des Methanophenazins im Gegensatz zum Ubichinon nicht aus einem, sondern aus drei aromatischen Ringen, aufgebaut ist. So ist es aufgrund seiner räumlichen Struktur schwer vorstellbar, dass drei Bindestellen für das Methanophenazin vorliegen. Zum anderen ist unklar, ob das Methanophenazin in der Lage ist, stabile Radikale zu bilden. Das Menachinon aus *A. fulgidus* weist hingegen eine aus zwei aromatischen Ringen aufgebaute Kopf-Gruppe auf und ist in der Lage stabile Semichinon-Radikale zu bilden. Nach dem Modell der indirekten Kopplung ist es eher vorstellbar, dass sich die Strukturunterschiede der Elektronenakzeptoren und der damit verbundene strukturelle Unterschied der Bindetasche sich auf die konformationsgetriebene Protonentranslokation auswirken. So ist es denkbar, dass sowohl die geringere zur Verfügung stehende freie Gibbs Energie, als auch die strukturellen Unterschiede, die sich aus der Nutzung dieser Elektronenakzeptoren ergeben, es der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase nur erlauben eine Konformation einzunehmen, die lediglich dazu ausreicht zwei Protonen zu translozieren. Stark vereinfacht schafft die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase nur eine halbe Umdrehung.

Nach dem sogenannten „mixed model“ existieren zwei voneinander getrennte Kopplungsstellen für die Protonentranslokation, wovon eine redoxgetrieben und die andere konformationsgetrieben sein soll. Der redox-getriebene Teil besteht aus dem membranintegralen Modul (NuoBCDI) und der Untereinheit H des membran-integralen Moduls. Dieser Teil verfügt über das Eisen-Schwefel-Zentrum N2, das als molekularer Schalter für die redox-getriebene Protonentranslokation fungieren könnte. Der

konformationsgetriebene Teil besteht demnach aus den Untereinheiten A,J,K,M und N und stellt die zweite Kopplungsstelle des Komplexes dar. Nach diesem Modell wäre es möglich, dass in der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase eine dieser Kopplungsstellen ausfällt und so lediglich zwei Protonen gepumpt werden. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um die konformationsgetriebene Pumpe. So sollte es der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase möglich sein, durch Reduktion der Elektronen-akzeptoren und anschließender Protonierung mit Protonen aus dem Cytoplasma einen klassischen Loop-Mechanismus der Protonentranslokation durchzuführen. Durch die andersartige Struktur der Akzeptoren und der damit verbundenen strukturellen Änderung der Bindetasche, die von den Untereinheiten D und H gebildet wird, könnte das Transporter-Modul in einer Konformation arretiert sein, die es der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase nicht ermöglicht, einen vektoriellen Protonentransport über die Cytoplasmamembran durchzuführen.

Die in dieser Arbeit analysierten $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen aus *A. fulgidus* und *Ms. mazei* können aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten aber auch wegen ihrer Unterschiede zu dem Komplex I, wertvolle Hinweise auf den Mechanismus der Protonentranslokation dieses initialen Komplexes der Atmungskette geben. Ebenso kann eine 3D-Struktur, der in dieser Arbeit bis zu Homogenität aufgereinigten und im Fall der F-Untereinheiten schon zur Kristallisation gebrachten Untereinheiten der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen entscheidende Hinweise auf die Struktur und Funktion des Komplex I geben. Vor allem vor dem Hintergrund der medizinischen Bedeutung der der Komplex I Defekte ist es wichtig, mehr über diesen Multi-Untereinheiten-Komplex der Atmungskette zu erfahren.

4.7 Die medizinische Bedeutung des Komplex I

Der Ausdruck Mitochondria wurde von dem deutschen Arzt Karl Benda (1857-1933) eingeführt und setzt sich aus dem griechischen Wort mitos für Faden und chondros für Getreide-Korn zusammen. Dieser Ausdruck beschreibt die Erscheinungsform der Mitochondrien, die in ihrer isolierten Form an ein Getreide-Korn erinnern und in der Zelle fusioniert, als fadenförmiges Retikulum vorliegen können (ROBINSON, 2001). Durchschnittlich besitzt eine Zelle 500 bis 2000 Mitochondrien; ihre wichtigste Aufgabe besteht in der Energieversorgung der Zelle mit ATP mittels einer membrangebundenen Elektronentransport-Phosphorylierung. Hierzu dient eine in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisierte Atmungskette. Diese ist aus fünf Enzym-Komplexen aufgebaut, und die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase stellt den initialen Komplex I dieser Atmungskette

dar. Die Mitochondrien des Menschen weisen ein eigenes 16,6 kb umfassendes Genom auf (ANDERSEN et al., 1981), welches durch cytoplasmatische Vererbung nur mütterlicherseits an die Nachkommen weitervererbt wird (GILES et al., 1980). Während der Eireife erfolgt die Vermehrung der Mitochondrien durch Teilung auf einige hunderttausend Mitochondrien pro Eizelle.

Bis auf 36 sind alle für den Aufbau der Mitochondrien benötigten Gene in der Zellkern-DNA lokalisiert. Die Gene des mitochondrialen Genoms (mtDNA) kodieren für 13 Proteine, 22 tRNAs und 2 rRNAs. Die Mitochondrien verfügen über ein eigenes Translationssystem, jedoch werden die Gene zur Kodierung der ribosomalen Proteine vom Zellkern gestellt. Diese genetische Symbiose (Endosymbionten-Theorie), gilt auch für funktionell zusammengehörige Proteine, wie etwa dem Komplex I der Atmungskette.

Der Komplex I ist einer der kompliziertesten bekannten Enzym-Komplexe. Das Protein ist aus 45 Untereinheiten aufgebaut, wovon 7 Untereinheiten von Genen der mtDNA kodiert werden, während die übrigen 38 kernkodiert sind (WEISS et al., 1991; HIRST et al., 2003). Bei den sieben mitochondrial kodierten Untereinheiten (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 und ND6) handelt es sich um die äußerst hydrophoben, membranintegralen Untereinheiten, welche homolog zu den Untereinheiten des prokaryotischen Komplex I sind (NuoH, N, A, M, K, L und J). Die entsprechenden homologen, membranintegralen Untereinheiten sind auch in den $F_{420}H_2$ -Dehydrogenasen aus *Methanosarcina*-Arten und *A. fulgidus* vorhanden. Somit scheint das membranintegrale Fragment essentiell für die Funktion des Komplex I bzw. Komplex I-ähnlicher Enzyme zu sein.

Bei einer von 10000 Lebendgeburten liegt eine Störung des Oxidativen-Phosphorylierungs-Systems (OXPHOS) vor, hierbei ist meist ein Defekt des Komplex I die Ursache (LOEFFEN et al., 2000). Aber auch bei später ausbrechenden Krankheiten, wie etwa der Parkinson'schen Krankheit wird eine Verbindung zu Komplex I Defekten vermutet (ORTH und SCHAPIRA, 2001). Generell kommt es bei Defekten des Komplex I zu einer Multifunktionsstörung mit fatalen Folgen. Die am stärksten betroffenen Gewebe sind die Zellen des Gehirns, des Herzens, der Nieren, der Leber oder der Skelett-Muskulatur, die sehr viel Energie verbrauchen. Im speziellen werden Mutationen und Deletionen in den Genen der sieben mitochondrial kodierten, aber auch in den kernkodierten Untereinheiten, für viele mitochondriale Krankheiten des Menschen verantwortlich gemacht (ROBINSON, 1998; TRIPELS et al., 2001). Unter einer mitochondrialen Krankheit versteht man das Ergebnis einer vererbten oder spontanen Mutation der Mitochondrien- oder Zellkern-DNA, welche zur

folgeschweren Veränderung eines mitochondrialen Proteins oder eines RNA-Moleküls beitragen kann (NAVIAUX, 1997).

Eine Fehlfunktion des Komplex I führt zu drei wesentlichen Problemen. Zum einen kommt es zu einer Beeinträchtigung der NADH-Oxidase-Funktion des Komplex I und einer damit verbundenen Erhöhung des zellulären NADH-Spiegels und einem Mangel an NAD^+ . Dies wiederum führt zu einer Beeinträchtigung des Krebs-Zyklus mit der Konsequenz eines Anstiegs des Laktat/Pyruvat Verhältnisses und der Keton-Körper (MUNNICH et al., 1992). Das zweite Problem liegt in der verminderten Fähigkeit des Komplex I, Protonen zu pumpen und einer dadurch verminderten ATP-Syntheserate. Letztlich kommt es zum besonders schwerwiegenden Problem, der Bildung von Superoxid-Radikalen, welche wiederum DNA-Mutationen, Lipid-Peroxidation und Protein-Denaturierung auslösen können. Diese reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) werden auch allgemein mit Vorgängen, des Alterns und des Zelltods (Apoptose) in Verbindung gebracht (ROBINSON, 1998; RAHA und ROBINSON, 2001). Die Bildung der Superoxid-Ionen soll nach ROBINSON (1998) durch Mutationen, die zu einer Blockierung des Elektronentransports auf Ubichinon führen, ausgelöst werden. Durch diesen unvollständigen Elektronentransport sollen vermehrt Semichinon-Radikale entstehen, welche den Elektronendonator für die Superoxid-Bildung darstellen. Durch das verstärkte Auftreten der Superoxid-Ionen und des veränderten Redox-Zustands der Zelle (NAD^+/NADH -Verhältnis) tritt die Induktion einer Superoxid-Dismutase ein, die aus den Superoxid-Radikalen Wasserstoffperoxid bildet. Durch die sogenannte Fenton-Reaktion



reagiert das Peroxid mit dem Eisen der Eisen-Schwefel-Zentren dann weiter zu den besonders zellschädigenden Hydroxyl-Radikalen.

Im Folgenden sollen kurz einige Phänotypen der Mutationen in den für den Komplex I-kodierenden Genen vorgestellt werden:

Punktmutationen in den Genen der mitochondrial kodierten Untereinheiten ND1, ND4, ND5 und ND6 werden mit der Leber'schen hereditären Optikus-Neuropathie (LOHNS) in Verbindung gebracht (EARLEY et al., 1987; DEGLI ESPOSTI et al., 1994; BOLHUIS et al., 1990; PULKES et al., 1999; OOSTRA et al., 1995). Diese Punktmutationen verursachten alle eine verminderte ATP-Syntheserate. Eine weitere Mutation des ND6 Gens wird als eine Ursache des sogenannten Leigh-Syndroms, einer neuropathologischen Erkrankung des Gehirns angesehen (JUN et al., 1994). Für das Auftreten der mitochondrialen Krankheit MELAS (mitochondriale Encephalomyopathie mit Laktat-Übersäuerung und Schlaganfall-

ähnlichen Episoden) werden sowohl Mutationen in der Untereinheit ND5 als auch in den Genen der mtDNA, die für tRNA's kodieren verantwortlich gemacht (GOTO, 1993; KIRPY et al., 1999; PULKES et al., 1999).

Jedoch sind Mutationen der mtDNA nicht der Hauptgrund für die auftretenden Komplex I-Defekte. Besonders im Kindesalter können nur 5 -10 % der Komplex I-Fehlfunktionen mit Mutationen der mtDNA in Verbindung gebracht werden. Mutationsanalysen an Patienten mit einem Komplex I-Defekt, bei denen eine Mutation der mtDNA ausgeschlossen werden konnte, ergaben weitere pathogene Mutationen der Gene der kernkodierten Untereinheiten des Komplex I (TRIEPELS et al., 2001). So konnten Mutationen in den Genen der kernkodierten Untereinheiten NDUFS7 und NDUFS8 (Nuo/Fqo/Fpo B und I Homologe) als eine weitere Ursache für das Leigh-Syndrom identifiziert werden (OHNISHI, 1998; LOEFFEN et al., 1989; TRIEPELS et al., 1999), während Mutationen im NDUFV1 Gen (NuoF Homolog) mit einer degenerativen Erkrankung der Markscheiden des ZNS (Leukodystrophie) verbunden mit einer myoklonischen Epilepsie in Verbindung gebracht wird (OHNISHI, 1998; SCHUELKE et al., 1999).

Die durch Mutationen ausgelösten Defekte im Komplex I der Atmungskette führen zu schwerwiegenden Folgen, die nicht nur auf die Elektronentransport-Phosphorylierung beschränkt sind, sondern vielmehr die gesamte Integrität der Zelle betreffen. Vor diesem Hintergrund kann sowohl der Komplex I der Prokaryonten, als auch die in dieser Arbeit untersuchte F₄₂₀H₂-Dehydrogenase der *Archaea* ein wertvolles Modell zur Aufklärung der molekularen Grundlagen dieser schweren mitochondrialen Krankheiten darstellen.

5. Zusammenfassung

- (1) Die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase der *Archaea* ist ein an der Energiekonservierung beteiligter Enzym-Komplex, dessen Untereinheiten große Ähnlichkeiten zu denen des Komplex I der Atmungskette der Pro- und Eukaryonten aufweisen. Die Gene *fqoF* und *fpoF*, die für die $F_{420}H_2$ -abhängigen Inputmodule der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase aus *A. fulgidus* und *Ms. acetivorans* kodieren, wurden mittels PCR amplifiziert und in die Expressionsvektoren pET 21c und pASK-IBA5 kloniert. Ebenso wurden das Gen *fpoO* aus *Ms. mazei* Gö1, dessen Funktion unbekannt ist und dessen Vorkommen auf die Gattung *Methanosarcina* beschränkt zu sein scheint, amplifiziert und in den Expressionsvektor pASK-IBA3 kloniert.
- (2) Die Untereinheiten der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase FqoF, FpoF und FpoO konnten erfolgreich in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3) in ihrer löslichen Form überproduziert werden. Anschließend wurden die Proteine bis zur Homogenität aufgereinigt. Hierbei konnte für die F-Untereinheit aus *A. fulgidus* eine molekulare Masse von 39 kDa, für das FpoF-Protein aus *Ms. acetivorans* eine Masse von 38 kDa und für die FpoO-Untereinheit aus *Ms. mazei* Gö1 eine molekulare Masse von 16 kDa ermittelt werden.
- (3) Es wurden Methoden etabliert, die eine schnelle, schonende und effektive Aufreinigung der Untereinheiten der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase ermöglichten. Die thermostabile Untereinheit FqoF aus *A. fulgidus* wurde sowohl mittels einer Hitzebehandlung und anschließender Chromatographie an Hydroxylapatit als auch über ein Strep-Tag-Fusionsprotein mit einer Affinitäts-Chromatographie an Strep-Tactin aufgereinigt. Die FpoF-Untereinheit aus *Ms. acetivorans* und die FpoO-Untereinheit aus *Ms. mazei* Gö1 wurden als Strep-Tag-Fusionsproteine isoliert. Die erhaltenen Ausbeuten aus 10 Litern Zellkultur betragen für das FqoF-Protein 37 mg, für das FqoF-Fusionsprotein 33 mg, für die FpoF-Untereinheit 15 mg und für das FpoO-Protein 12 mg.
- (4) Die heterolog produzierten und aufgereinigten Untereinheiten wiesen alle aus der Primärsequenz vorausgesagten prosthetischen Gruppen auf. Der ermittelte Flavin-Gehalt betrug für die FqoF-Untereinheit 0,83 mol und für die FpoF-Untereinheit 0,92 mol Flavin pro mol Protein. Der Gehalt an Nicht-Häm-Eisen und säurelabilen

Schwefel konnte mit 14 und 7 mol pro mol Enzym für das FqoF-Protein sowie mit 8 und 7 mol pro mol Protein für die FpoF-Untereinheit ermittelt werden. Die aufgereinigte FpoO-Untereinheit wies einen Nicht-Häm-Eisen-Gehalt von 1,6 mol und einen Gehalt an säurelabilem Schwefel von 1,5 mol pro mol Protein auf. Im Gegensatz zu den F-Untereinheiten war das [Fe-S]-Zentrum der O-Untereinheit sauerstofflabil.

- (5) Die aufgereinigten F-Untereinheiten wiesen eine $F_{420}H_2$ -abhängige Dehydrogenase Aktivität auf. Die spezifische Aktivität der FqoF-Untereinheit des hyperthermophilen Organismus *A. fulgidus* betrug 64 U/mg bei einer Temperatur von 78 °C. Das mesophile Protein FpoF aus *Ms. acetivorans* wies eine spezifische Aktivität von 10 U/mg bei Raumtemperatur auf.
- (6) Mittels UV-Vis- und EPR-Spektroskopie konnten die prosthetischen Gruppen der aufgereinigten Proteine näher charakterisiert werden. Die UV-Vis Spektren der F-Untereinheiten ergaben die für Eisen-Flavo-Proteine typischen Redox-Spektren. Hierbei wies das nicht-kovalent gebundene FAD Absorptionsmaxima bei 380 und 450 nm auf, die durch Reduktion der Proteine gebleicht wurden. Die vierkernigen Eisen-Schwefel-Zentren der FpoF- und FqoF-Untereinheiten zeigten ein Absorptions-Maximum bei 325 nm im oxidierten Zustand, das sich ebenfalls durch Reduktion bleichen ließ. In ersten EPR-Studien konnten Hinweise auf das Vorkommen von drei [4Fe-4S]-Zentren in den F-Untereinheiten gefunden werden. Im Fall der FqoF-Untereinheit aus *A. fulgidus* handelt es sich um zwei [4Fe-4S]-Zentren mit einer rhombischen und eines mit einer axialen Symetrie, während die FpoF-Untereinheit aus *Ms. acetivorans* EPR Signale für zwei axiale und ein rhombisches [4Fe-4S]-Zentrum aufwies. Nach Reduktion mit Natrium-Dithionit zeigten beide F-Untereinheiten ein isotropes EPR-Signal mit einem g-Wert von 2.006, das typisch für ein FAD-Semichinon ist. Die FpoO-Untereinheit aus *Ms. mazei* Gö1 zeigte EPR-Signale, die für ein axiales [2Fe-2S]-Zentrum sprachen.
- (7) Eine DNA-Bindeeigenschaft des FpoO-Proteins konnte nicht nachgewiesen werden. FpoO zeigte weder eine Bindung an die mittels PCR amplifizierte Promotor-Bereiche des *fpo*-Operons noch an den Promotor-Bereich des *fpoF*-Gens.

- (8) In Kristallisationsstudien mit den Inputmodulen FqoF und FpoF der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *A. fulgidus* und *Ms. acetivorans* konnten beide Untereinheiten zur Kristallisation gebracht werden. Als geeignete Kristallisations-Bedingung für das FqoF-Protein erwies sich eine Mutterlösung mit 70 % MPD, 0,1 M HEPES und einem pH von 7,5. Die FpoF-Untereinheit konnte hingegen unter der Bedingung von 20 % PEG 3350, 0,2 M Zinkacetat und einem pH von 7,5 kristallisiert werden. Jedoch wiesen die Kristalle nicht die erforderliche Streuung im Röntgenstrahl auf.

6. Literaturverzeichnis

Abbanat, D. R., Ferry, J. G., 1991. Resolution of component proteins in an enzyme complex from *Methanosarcina thermophila* catalyzing the synthesis or cleavage of acetyl-CoA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 3272-3276.

Abken, H.-J., 1997. Reinigung und Charakterisierung der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase und Identifizierung von Methanophenazin als neuartigen methanogenen Cofaktor. Dissertation, Universität Göttingen.

Abken, H.-J., Deppenmeier, U., 1997. Purification and properties of an F₄₂₀H₂-Dehydrogenase from *Methanosarcina mazei* Gö1. FEMS Lett. **154**: 231-237.

Abken, H. J., Tietze, M., Brodersen, J., Bäumer, S., Beifuß, U., Deppenmeier, U., 1998. Isolation and Characterization of Methanophenazine and Function of Phenazine in Membrane-Bound Electron Transport of *Methanosarcina mazei* Gö1. Journal of Bacteriology **180**: 2027-2032.

Achenbach-Richter, L., Stetter, K. O., Woese, C. R., 1987. A possible biochemical missing link among archaebacteria. Nature **328**: 348-349.

Albracht S. P. J. and Hedderich R. 2000. Learning from hydrogenases: location of a proton pump and of a second FMN in bovine NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). FEBS Lett. **485**: 1-6.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. **290**: 457-465.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K., 1987. Current protocols in molecular biology. Green Publishing Associates and Wiley-Interscience. J. Wiley & Sons, New York.

Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R. and Wolfe, R. S., 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* **43**: 260-296.

Bäumer S., Ide T., Jacobi C., Johann A., Gottschalk G., Deppenmeier U. 2000. The F₄₂₀H₂ Dehydrogenase from *Methanosarcina mazei* is a redox-driven proton pump closely related to NADH Dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **275**: 17968-17973.

Becher B, Müller V., 1994. Delta mu Na⁺ drives the synthesis of ATP via an delta mu Na(+)-translocating F₁F₀-ATP synthase in membrane vesicles of the archaeon *Methanosarcina mazei* Go1. *J Bacteriol.* **176**: 2543-2550.

Beeder, J., Nilsen, R.K., Rosnes, J.T., Torsvik, T., Lien, T., 1994. *Archaeoglobus fulgidus* Isolated from Hot North Sea Oil Field Waters. *App. Environ. Microbiol.* **60**: 1227-1231.

Beinert H., 1983. Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins. *Anal Biochem.* **131**: 373-378.

Beinert H., Holm R.H., Munck E., 1997. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science.* **277**: 653-659.

Bertram P.A., Thauer R.K., 1994. Thermodynamics of the formylmethanofuran dehydrogenase reaction in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Eur. J. Biochem.* **226**: 811-8.

Birnboim, C. & Doly, J., 1979. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.

Blaut, M., Gottschalk, G., 1984. Coupling of ATP-synthesis and methane formation from methanol and molecular hydrogen in *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **141**: 217-222.

Blaut, M., Müller, V., Gottschalk, G., 1987. Proton translocation coupled to methanogenesis from methanol and hydrogen in *Methanosarcina barkeri*. *FEBS Lett.* **217**: 53-57.

Blaut, M., 1994. Metabolism of methanogens. *Antonie van Leeuwenhoek.* **66:** 187-208.

Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8:** 93-99.

Bobik, T. A., Olson, K. D., Noll, K. M., Wolfe, R. S., 1987. Evidence that the heterodisulfide of coenzyme M and 7-mercaptoheptanoylthreonine phosphate is a product of the methylreductase reaction in *Methanobacterium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149:** 455-460.

Böhm, R., Sauter, M., Böck, A., 1990. Nucleotide sequence and expression of an operon in *Escherichia coli* coding for formate hydrogenlyase components. *Mol. Microbiol.* **4:** 231-243.

Bogachev A.V., Murtazina R.A., Skulachev V.P. 1996. H⁺/e⁻ stoichiometry for NADH dehydrogenase I and dimethyl sulfoxide reductase in anaerobically grown *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol.* **178:** 6233-6237.

Bolhuis P.A, Bleeker-Wagemakers E.M, Ponne N.J, Van Schooneveld M.J, Westerveld A., Van den Bogert C., Tabak H.F., 1990. Rapid shift in genotype of human mitochondrial DNA in a family with Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* **170:** 994-997.

Boone, D. R., Whitman, W. B., Rouviere, P. E., 1993. Diversity and taxonomy of methanogens. In: Ferry, J.G. (ed.), *Methanogenesis*, Chapman & Hall, New York-London: 35-80.

Bottcher B., Scheide D., Hesterberg M., Nagel-Steger L., Friedrich T., 2002. A novel, enzymatically active conformation of the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem.* **277:** 17970-17977.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72:** 248-254.

Brandt U., 1997. Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim Biophys Acta*. **1318**: 79-91.

Brandt U., Kerscher S., Droese S., Zwicker K., Zickermann V., 2003. Proton pumping by NADH:ubiquinone-oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism? *FEBS Lett*. **545**: 9-17.

Braun, M., Bungert, S., Friedrich, T., 1998. Characterization of the overproduced NADH dehydrogenase fragment of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**: 1861-1867.

Breitung, J., Thauer, R. K., 1990. Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Identification of N5-formyltetrahydromethanopterin as the product. *FEBS Lett*. **275**: 226-230.

te Brommelstroet, B. W., Geerts, W. J., Keltjens, J. T., van der Drift, C., Vogels, G. D., 1991. Purification and properties of 5,10-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase and 5,10-methylenetetrahydromethanopterin reductase, two coenzyme F₄₂₀-dependent enzymes, from *Methanosarcina barkeri*. *Biochim. Biophys. Acta* **1079**: 293-302.

Brown, J. R., Doolittle, W. F., 1997. *Archaea* and the Prokaryote-to-Eukaryote transition. *Mikrobiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 456-502.

Brüggemann, H., 1999. Vergleichende molekularbiologische Untersuchungen zur F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *Archaeoglobus fulgidus* und *Methanosarcina mazei* Gö1. Diplomarbeit, Universität Göttingen.

Brüggemann, H., Falinski, F., Deppenmeier, U., 2000. Structure of the H₂:quinone oxidoreductase of *Archaeoglobus fulgidus*. Identification and overproduction of the F₄₂₀H₂-oxidizing subunit. *Eur. J. Biochem.* **267**: 5810-5814.

Bryant, M. P., 1972. Commentary on the hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *AM. J. Clin. Nutr.* **25**: 1324-1328.

Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougerty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghagen, N. S. M., Weidman, J. F., Fuhrmann, J. L., Nguyen, D., Utterback, T. R., Kelley, J. M., Peterson, J. D., Sadow, P. W., Hanna, M. C., Cotton, M. D., Roberts, K. M., Hurst, M. A., Kaine, B. P., Borodovsky, M., Klenk, H. P., Fraser, C. M., Smith, H. O., Woese, C. R., Venter, J. C., 1996. Complete Genome Sequence of the Methanogenic Archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**: 1058-1073.

Bungert S., Krafft B., Schlesinger R., Friedrich T., 1999. One-step purification of the NADH dehydrogenase fragment of the *Escherichia coli* complex I by means of Strep-tag affinity chromatography. *FEBS Lett.* **460**: 207-11.

Buss, K. A., Cooper, D. R., Ingram-Smith, C., Ferry, J. G., Sanders, D. A., Hasson, M. S., 2001. Urkinase: structure of acetate kinase, a member of the ASKHA superfamily of phosphotransferases. *J. Bacteriol.* **183**: 680-686.

Buss, K. A., Ingram-Smith, C., Ferry, J. G., Sanders, D. A., Hasson, M. S., 1997. Crystallization of acetate kinase from *Methanosarcina thermophila* and prediction of its fold. *Protein Sci.* **6**: 2659-2662.

Cammack, R., Sykes, A.G., 1999. *Advances In Inorganic Chemistry: Iron Sulfur Proteins.* Vol. **47**

Chester, N. & Marshak, D. R., 1993. Dimethyl sulfoxid-mediated primer T_m reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **209**: 284-290.

Chamberlin, M., Ring, J., 1973. Characterization of T7-specific ribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.* **248**: 2235-2250.

Cline J.D., 1969. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol.Oceanogr.* 14: 454-458.

Colomb, M., Chamberlin, M., 1974. Characterization of T7-specific ribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.* **249**: 2858-2863.

Conrad R. 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiol Rev.* **60**: 609-640.

Crofts A.R., Berry E.A., 1998. Structure and function of the cytochrome *bc*₁ complex of mitochondria and photosynthetic bacteria. *Curr Opin Struct Biol.* **8**:501-509.

Dahl, C., Koch, H.-G., Keuken, O., Trüper, H. G., 1990. Purification and characterization of ATP sulfurylase from the extremely thermophilic archaeobacterial sulfate-reducer *Archaeoglobus fulgidus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**: 27-32.

Dai, Y. R., Reed, D. W., Millstein, J. H., Hartzell, P. L., Grahame, D. A. and DeMoll, E., 1998. Acetyl-CoA decarbonylase/synthase complex from *Archaeoglobus fulgidus*. *Arch. Microbiol.* **169**: 525-529.

Darrouzet E., Issartel J.P., Lunardi J., Dupuis A. 1998. The 49-kDa subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) is involved in the binding of piericidin and rotenone, two quinone-related inhibitors. *FEBS Lett.* **431**: 34-8.

Deppenmeier, U., Blaut, M., Mahlmann, M., Gottschalk, G., 1990. Reduced coenzyme F₄₂₀H₂-dependent heterodisulfide oxidoreductase: a proton translocating system in methanogenic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9449-9453.

Deppenmeier, U., Blaut, M., Mahlmann, A., Gottschalk, G., 1990. Membrane-bound F₄₂₀H₂-dependent heterodisulfide reductase in methanogenic bacterium strain Göl and *Methanlobus tindarius*. *FEBS Lett.* **261**: 199-203.

Deppenmeier, U., Blaut, M., Gottschalk, G., 1991. H₂ : heterodisulfide oxidoreductase, a second energy-conserving system in the methanogenic strain Gö1. Arch. Microbiol. **155**: 272-277.

Deppenmeier, U., Blaut, M., Schmidt, B., Gottschalk, G., 1992. Purification and properties of a F₄₂₀-nonreactive membrane-bound hydrogenase from *Methanosarcina* strain Gö1. Arch. Microbiol. **157**: 505-511.

Deppenmeier, U., 1995. Different structure and expression of the operons encoding the membrane-bound hydrogenases from *Methanosarcina mazei* Gö1. Arch. Microbiol. **164**: 370-376.

Deppenmeier, U., Müller, V., Gottschalk, G., 1996. Pathways of energy conservation in methanogenic *Archaea*. Arch. Microbiol. **165**: 149-163.

Deppenmeier, U., Linhard T., Gottschalk, G., 1999. Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic *archaea*. FEBS Lett. **457**: 291-297.

Deppenmeier, U., 2002a. The unique biochemistry of methanogenesis. Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol. **71**: 223-283.

Deppenmeier, U., 2002b. Redox-driven proton translocation in methanogenic *Archaea*. Cell. Mol. Life Sci. **59**: 1-21.

Deppenmeier, U., Johann, A., Hartsch, T., Merkl, R., Schmitz, R. A., Martinez-Arias, R., Henne, A., Wiezer, A., Bäumer, S., Jacobi, C., Brüggemann, H., Lienard, T., Christmann, A., Bomeke, M., Steckel, S., Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Overbeek, R., Klenk, H. P., Gunsalus, R. P., Fritz, H. J., Gottschalk, G., 2002. The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and *archaea*. J Mol Microbiol Biotechnol. **4**: 453-61.

De Rosa, M., Gambacorta, A., 1988. The Lipids of archaeobacteria. Prog. Lipid. Res. **27**: 153-175.

Devereux, J., Haerberli, P. & Smithers, O., 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* **12**: 387-395.

Dimroth P, Wang H, Grabe M, Oster G. , 1999 Energy transduction in the sodium F-ATPase of *Propionigenium modestum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **96**: 4924-9.

Ding, Y. H., Zhang, S. P., Tomb, J. F., Ferry, J. G., 2002. Genomic and proteomic analyses reveal multiple homologs of genes encoding enzymes of the methanol:coenzyme M methyltransferase system that are differentially expressed in methanol- and acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**: 127-132.

Di Ruggiero, J., Brown, J. R., Bogert, A. P., Robb, F. T., 1999. DNA Repair Systems in *Archaea*: Mementos from the Last Universal Common Ancestor? *J. Mol. Evol.* **49**: 474-484.

Djafarzadeh R., Kerscher S., Zwicker K., Radermacher M., Lindahl M., Schagger H., Brandt U., 2000. Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta.* **1459**: 230-238.

Dubendorff, J. W., Studier, F. W., 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J. Mol. Biol.* **219**: 45-59.

Duarte, M., Populo, H., Videira, A., Friedrich, T., Schulte, U., 2002. Disruption of iron-sulphur cluster N2 from NADH: ubiquinone oxidoreductase by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* **364**: 833-839.

Duin, E. C., Madadi-Kahkesh, S., Hedderich, R., Clay, M. D., Johnson, M. K., 2002. heterodisulfide reductase from *Methanothermobacter marburgensis* contains an active-site [4Fe-4S] cluster that is directly involved in mediating heterodisulfide reduction. *FEBS letters.* **512**: 263-268.

Dupuis, A., Prieur, I., Lunardi, J., 2001. Toward a characterization of the connecting module of complex I. *Bioenerg. Biomembr.* **33**: 159-168.

Dunn, J. J., Studier, F. W., 1983. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol.* **166**: 477-535.

Dutton, P. L., Moser, C. C., Sled, V. D., Daldal, F., Ohnishi, T., 1998. A reductant-induced oxidation mechanism for complex I. *Biochim. Biophys. Acta.* **1364**: 245-257.

Dym O, Eisenberg D., 2001. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci.* **10**: 1712-28.

Earley F.G., Patel S.D., Ragan I., Attardi G., 1987. Photolabelling of a mitochondrially encoded subunit of NADH dehydrogenase with [3H]dihydrorotenone. *FEBS Lett.* **219**: 108 - 112.

Ellermann, J., Hedderich, R., Böcher, R., Thauer, R. K., 1988. The final step in methane formation. *Eur. J. Biochem.* **172**: 669-677.

Enssle, M., Zirngibl, C., Linder, D., Thauer, R.K., 1991. Coenzyme F₄₂₀-dependent N⁵,N¹⁰-methylentetrahydromethanopterin dehydrogenase in methanol grown *Methanosarcina barkeri*. *Arch. Microbiol.* **155**: 483-490

Ermler, U., Merckel, M., Thauer, R. K., Shima, S., 1997. Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase from *Methanopyrus kandleri* - new insights into salt-dependence and thermostability. *Structure* **5**: 635-646.

Falinski, F., 2003. Überproduktion von Subkomplexen der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *A. fulgidus* und abschließende Untersuchungen zur Verbreitung von Methanophenazin in methanogenen *Archaea*. Dissertation, Universität Göttingen

Ferry, J. G., 1992. Biochemistry of methanogenesis. *Critic. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**: 473-503.

Ferry, J. G., 1993. Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and genetics. Chapman & Hall, New York, London

Ferry, J. G., 1995. CO dehydrogenase. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 305-333.

Ferry, J. G., 1997. Enzymology of the fermentation of acetate to methane by *Methanosarcina thermophila*. *Biofactors* **6**: 25-35.

Finel M., 1998. Organisation and evolution of structural elements within complex I. *Biochim. Biophys. Acta.* **1364**: 112-121.

Fish W.W., 1988. Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol.* **158**: 357-64.

Fisher N., Rich P.R., 2000. A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems. *J. Mol. Biol.* **296**: 1153-1162.

Friedrich, T., Weiss, H., 1997. Modular Evolution of the Respiratory NADH:Ubiquinone Oxidoreductase and the Origin of its Modules. *J. theor. Biol.* **187**: 529-540.

Friedrich, T., Abelmann, A., Brors, B., Guenebaut, V., Kintscher, L., Leonard, K., Rasmussen, T., Scheide, D., Schlitt, A., Schulte, U., Weiss, H., 1998. Redox components and structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta.* **1365**: 215-219.

Friedrich, T., 1998. The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* **1364**: 134-46.

Friedrich T., Brors B., Hellwig P., Kintscher L., Rasmussen T., Scheide D., Schulte U., Mantle W., Weiss H. 2000. Characterization of two novel redox groups in the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim Biophys Acta.* **1459**: 305-9.

Friedrich, T., 2001. Complex I: a chimaera of a redox and conformation-driven proton pump? *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**:169-177.

Friedrich, T., Scheide, D., 2000. The respiratory complex I of bacteria, *archaea* and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. FEBS Lett. **479**: 1-5.

Galagan JE, Nusbaum C, Roy A, Endrizzi MG, Macdonald P, FitzHugh W, Calvo S, Engels R, Smirnov S, Atnoor D, Brown A, Allen N, Naylor J, Stange-Thomann N, DeArellano K, Johnson R, Linton L, McEwan P, McKernan K, Talamas J, Tirrell A, Ye W, Zimmer A, Barber RD, Cann I, Graham DE, Grahame DA, Guss AM, Hedderich R, Ingram-Smith C, Kuettner HC, Krzycki JA, Leigh JA, Li W, Liu J, Mukhopadhyay B, Reeve JN, Smith K, Springer TA, Umayam LA, White O, White RH, Conway de Macario E, Ferry JG, Jarrell KF, Jing H, Macario AJ, Paulsen I, Pritchett M, Sowers KR, Swanson RV, Zinder SH, Lander E, Metcalf WW, Birren B., 2002. The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. Genome Res. **12**: 532-542.

Gayda J.P., Gibson J.F., Cammack R., Hall D.O., Mullinger R. 1976. Spin lattice relaxation and exchange interaction in a 2-iron, 2-sulphur protein. Biochim Biophys Acta. **434**: 154-163.

Galkin A.S., Grivennikova V.G., Vinogradov A.D. 1999 H⁺/2e⁻ stoichiometry in NADH-quinone reductase reactions catalyzed by bovine heart submitochondrial particles. FEBS Lett. **451**: 157-161.

Garcia J. L., Bharat K. C. Ptel, Ollivier, B., 2000. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic *Archaea*. Anaerobe **6**: 205.

Gemperli A.C., Dimroth P., Steuber J., 2002. The respiratory complex I (NDH I) from *Klebsiella pneumoniae*, a sodium pump. J Biol Chem. **277**: 33811-33817.

Giles R.E., Blanc H., Cann H.M., Wallace D.C., 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proc. Nat. Acad. Sc. USA. **77** :6715 - 6719.

Gishla S., 1980. Methods Enzymol. **66**: 360-373.

Goto Y., 1993. MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy lactic acidosis, and stroke-like episodes): clinical features and mitochondrial DNA mutations. *Nippon Rinsho* **51**: 2373 - 2378.

Gottschalk, G., and Thauer, R. K., 2001. The Na(+)-translocating methyltransferase complex from methanogenic *archaea*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1505**: 28-36.

Green J., Irvine A.S., Meng W., Guest J.R., 1996. FNR-DNA interactions at natural and semi-synthetic promoters. *Mol Microbiol.* **19**: 125-137.

Greene, R. J., Guarente, L., 1987. Subcloning. *Methods Enzymol.* **152**: 512-521.

Grigorieff N., 1998. Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 2.2 Å in ice. *J Mol Biol.* **277** : 1033-46.

Guenebaut V., Schlitt A., Weiss H., Leonard K., Friedrich T., 1998. Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Mol Biol.***276**: 105-112.

Haase, P., Deppenmeier, U., Blaut, M., Gottschalk, G., 1992. Purification and characterization of F₄₂₀H₂-dehydrogenase from *Methanobacterium tindarius*. *Eur. J. Biochem.* **203**: 527-531.

Halboth, S., Klein, A., 1992. *Methanococcus voltae* harbors four gene clusters potentially encoding two [NiFe] and two [NiFeSe] hydrogenases, each of the cofactor F₄₂₀-reducing or F₄₂₀-non-reducing types. *Mol. Gen. Genet.* **233**: 217-224.

Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

Harms U, Thauer R.K., 1996. The corrinoid-containing 23-kDa subunit MtrA of the energy-conserving N⁵-ethyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. EPR spectroscopic evidence for a histidine residue as a cobalt ligand of the cobamide. *Eur J Biochem.* **241**:149-54

- Harms U, Thauer R.K.,** 1996. Methylcobalamin: coenzyme M methyltransferase isoenzymes MtaA and MtbA from *Methanosarcina barkeri*. Cloning, sequencing and differential transcription of the encoding genes, and functional overexpression of the mtaA gene in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.*; **235**:653-9.
- Hedderich, R., Berkessel, A., Thauer, R. K.,** 1990. Purification and properties of heterodisulfide reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg). *Eur. J. Biochem.* **193**: 255-261.
- Heiden, S., Hedderich, R., Setzke, E., Thauer, R. K.,** 1993. Purification of a cytochrome b containing H₂:heterodisulfide oxidoreductase complex from membranes of *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **213**: 529-535.
- Hellwig, P., Scheide, D., Bungert, S., Mäntele, W., Friedrich, T.,** 2000. FT-IR spectroscopic characterization of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*: oxidation of FeS cluster N2 is coupled with the protonation of an aspartate or glutamate side chain. *Biochemistry* **39**: 10884-10891.
- Hirst J., Carroll J., Fearnley I.M., Shannon R.J., Walker J.E.,** 2003. The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* **1604**:135-150.
- Hofhaus G., Weiss H., Leonard K.,** 1991. Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I). *J Mol Biol.* **221**: 1027-1043.
- Hopkins N., Stanley R.J.,** 2003. Measurement of the electronic properties of the flavoprotein old yellow enzyme (OYE) and the OYE:p-Cl phenol charge-transfer complex using Stark spectroscopy. *Biochemistry.* **42**: 991-999.
- Horowitz, J. P., Chua, J., Curby, R. J., Thomson, M. A., Da Rooge, M. A., Fischer, B. E., Mauricio, J., Klundt, I.,** 1964. Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indoyl- β ,D-glycopyranosides. *J. Med. Chem.* **7**: 547-548.

Huber, H., Michael, J. H., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C., Stetter, K. O., 2002. A new phylum of *Archaea* represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63-67.

Hungate, R. E., 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris J.R. und Ribbons, D.W. (Ed.) *Methods in Microbiology*, Academic Press, New York, London. **3b**: 117-132.

Ide, T., Bäumer, S., Deppenmeier, U., 1999. Energy conservation by the H₂:heterodisulfide oxidoreductase from *Methanosarcina mazei* Gö1: identification of two proton-translocation segments. *J. Bacteriol.* **181**: 4076-4080.

Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.

Ito M., Guffanti A. A., Krulwich T. A., 2001. Mrp-dependent Na(+)/H(+) antiporters of *Bacillus* exhibit characteristics that are unanticipated for completely secondary active transporters. *FEBS Lett.* **496**: 117-120.

Iverson T.M., Luna-Chavez C., Cecchini G., Rees D.C., 1999. Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science*. **284**: 1961-6.

Jablonski, P. E., Ferry, J. G., 1991. Purification and properties of methyl coenzyme M methylreductase from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* **173**: 2481-2487.

Jarrel, K. F., Kalmokoff, M. L., 1988. Nutritional requirement of the methanogenic archaeobacteria. *Can. J. Microbiol.* **34**: 557.

Jones, W. J., Nagle, D. P., Whitman, W., 1987. Methanogens and the diversity of archaeobacteria. *Microbiol. Rev.* **51**: 135-177.

Jun A.S., Brown M.D., Wallace D.C., 1994. A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 6206 - 6210.

Jussofie, A., Mayer, F. Gottschalk, G., 1986. Methane formation from methanol and molecular hydrogen by protoplasts of new methanogenic isolates and inhibition by dicyclohexylcarbodiimid. *Arch. Microbiol.* **146**, 245-249

Kaesler B, Schönheit P., 1989. The sodium cycle in methanogenesis. CO₂ reduction to the formaldehyde level in methanogenic bacteria is driven by a primary electrochemical potential of Na⁺ generated by formaldehyde reduction to CH₄. *Eur. J. Biochem.* **186**: 309-16.

Kaesler B, Schönheit P., 1989. The role of sodium ions in methanogenesis. Formaldehyde oxidation to CO₂ and 2H₂ in methanogenic bacteria is coupled with primary electrogenic Na⁺ translocation at a stoichiometry of 2-3 Na⁺/CO₂. *Eur J Biochem.***184**: 223-32.

Kandler, O., König, H., 1978. Chemical composition of the peptidoglycan -free cell walls of methanogenic bacteria. *Arch. Microbiol.* **118**: 141-152.

Karrasch M., Borner G., Enssle M., Thauer R.K., 1989. Formylmethanofuran dehydrogenase from methanogenic bacteria, a molybdoenzyme. *FEBS Lett.* **253**: 226-230.

Kashani-Poor, N., Zwicker, K., Kerscher, S., Brandt, U., 2001. A central functional role for the 49-kDa subunit within the catalytic core of mitochondrial complex I. *J. Biol. Chem.* **276**: 24082-24087.

Kashani-Poor N, Kerscher S, Zickermann V, Brandt U., 2001 Efficient large scale purification of his-tagged proton translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta.* **1504**(2-3):363-70.

Kerscher, S., Kashani-Poor, N., Zwicker, K., Zickermann, V., Brandt, U., 2001. Exploring the catalytic core of complex I by *Yarrowia lipolytica* yeast genetics. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**: 187-196.

Kirby D.M., Crawford M., Cleary M.A., Dahl H.H., Dennett X, Thorburn D.R., 1999. Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology*. **52**: 1255 - 1264.

Klenk, H. P., Clayton, R. A., Tomb, J. F., White, O., Nelson, K. A., Dodson, R. J., Gwinn, M., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Richardson, D. L., Kerlavage, A. R., Graham, D. E., Kyrpides, N. C., Fleischmann, R. D., Quackenbusch, J., Lee, N. H., Sutton, G. G., Gill, S., Kirkness, E. F., Dougherty, B. A., McKenny, K., Adams, M. D., Loftus, B., Venter, J. C., 1997. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**: 364-370.

Kraut, J., Straks, G., 1968. Low resolution electron density and anomalous scattering-density maps of *Chromatium* high potential iron protein. *J. Mol. Biol.* **35**: 503 – 512.

Krebs W., Steuber J., Gemperli A.C., Dimroth P., 1999. Na⁺ translocation by the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **33**: 590-598.

Künkel, A., Vaupel, M., Heim, S. Thauer, R.K., Hedderich, R., 1997. Heterodisulfide reductase from methanol-grown cells of *Methanosarcina barkeri* is not a flavoprotein, *Eur. J. Biochem.* **244**: 226-234.

Künkel, A., Vorholt, J. A., Thauer, R. K., Hedderich, R., 1998. An *Escherichia coli* hydrogenase-3-type hydrogenase in methanogenic *archaea*. *Eur. J. Biochem.* **252**: 467-476.

Kunow, J., Linder, D., Stetter, K. O., Thauer, R. K., 1994. F₄₂₀H₂: quinone oxidoreduktase from *Archaeoglobus fulgidus*. Characterization of a membrane-bound multisubunit complex containing FAD and iron-sulfur clusters. *Eur. J. Biochem.* **223**: 503-511.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lambin, P., Rochu, D., Fine, J. M., 1976. A new method for determination of molecular weights of proteins by electrophoresis across a sodium dodecylsulfate (SDS)-polyacrylamide gradient gel. *Anal. Biochem.* **74**: 567-575.

Lancaster C.R., Kroger A., Auer M., Michel H., 1999. Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution. *Nature.* **402**: 377-385.

Latimer, M. T., Ferry, J. G., 1993. Cloning, sequence analysis, and hyperexpression of the genes encoding phosphotransacetylase and acetate kinase from *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* **175**: 6822-6829.

Lazizzera B.A., Beinert H., Khoroshilova N., Kennedy M.C., Kiley P.J., 1996. DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *J Biol Chem.* **271**: 2762-8.

Leif, H., Sled, V. D., Ohnishi, T., Weiss, H., Friedrich, T., 1995. Isolation and characterization of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **230**: 538-548.

Leonard K., Haiker H., Weiss H., 1987. Three-dimensional structure of NADH: ubiquinone reductase (complex I) from *Neurospora* mitochondria determined by electron microscopy of membrane crystals. *J Mol Biol.* **194**: 277-86.

Lienard, T., Becher, B., Marschall, M., Bowien, S., Gottschalk, G., 1996. Sodium ion translocation by N⁵-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina mazei* Gö1 reconstituted in ether lipid liposomes. *Eur. J. Biochem.* **239**: 857-864.

Lippard, S.J., Berg, J.M., 1995. *Bioanorganische Chemie*. Spektrum. Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford.

Loeffen J., Smeitink J., Triepels R., Smeets R., Schuelke M., Sengers R., Trijbels F., Hamel B., Mullaart R., van den Heuvel L., 1998. The First nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **63**:1598 - 1608.

Loeffen J.L., Smeitink J.A., Trijbels J.M., Janssen A.J., Triepels R.H., Sengers R.C., van den Heuvel L.P., 2000. Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum. Mutat.* **15**: 123 - 134.

Loeffen J., Elpeleg O., Smeitink J., Smeets R., Stöckler-Ipsiroglu S., Mandel H., Sengers R., Trijbels F., van den Heuvel L., 2001. Mutations in the complex I *NDUFS2* gene are associated with hypertrophic cardiomyopathy cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* **379**: 299 - 301.

Ma, K., Thauer, R. K., 1990a. Purification and properties of N^5 , N^{10} -methylenetetrahydromethanopterin reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg). *Eur. J. Biochem.* **191**: 187-193.

Ma, K., Thauer, R. K., 1990b. Single step purification of methylenetetrahydromethanopterin reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* by specific binding to blue sepharose CL-6B. *FEBS Lett.* **268**: 59-62.

Ma, K., Zirngibl, C., Linder, D., Stetter, K. O., Thauer, R. K., 1991. N^5 , N^{10} -methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (H_2 -forming) from the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri*. *Arch. Microbiol.* **156**: 43-48.

Mander, G. J., Duin, E. C., Linder, D., Stetter, K. O., Hedderich R., 2002. Purification and characterization of a membrane-bound enzyme complex from the sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* related to heterodisulfide reductase from methanogenic *archaea*. *Eur. J. Biochem.* **269**: 1895-1904.

Marck, C., 1988. „DNA Strider“: a „C“ programm for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucl. Acids Res.* **16**: 1829.

Marmur, J., 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218.

Marusyk, R. & Sergeant, A., 1980. A simple method for dialysis of small volume samples. *Anal. Biochem.* **105**: 403-404.

Massey, V., Hemmerich, P., 1980. Active-site probes of flavoproteins. *Biochem. Soc. Trans.* **8**: 246-257.

Maupin-Furlow, J. A., Ferry, J. G., 1996. Analysis of the CO- Dehydrogenase/Acetyl-Coenzyme A Synthase Operon of *Methanosarcina thermophila*. *Journal of Bacteriology* **178**: 6849-6856.

McPherson, A., 1982: *The Preparation and Analysis of Protein Crystals*. Wiley, N.Y.

McPherson, A., 1990. Current Approaches to Macromolecular Crystallization. *Eur. J. Biochem.* **189**: 1-23.

Meuer, J., Bartoschek, S., Koch, J., Künkel, A. & Hedderich, R., 1999. Purification and catalytic properties of Ech hydrogenase from *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **265**: 325-335.

Meuer J., Kuettner H.C., Zhang J.K., Hedderich R., Metcalf W.W., 2002. Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**: 5632-5637.

Michel, R., Massanz, C., Kostka, S., Richter, M., Fiebig, K., 1995. Biochemical characterization of the 8-hydroxy-5-deazaflavin-reactive hydrogenase from *Methanosarcina barkeri* Fusaro. *Eur. J. Biochem.* **233**: 727-735.

Michel, H., Behr J., Harrenga, A., Kannt, A. 1998. CYTOCHROME C OXIDASE: Structure and Spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**: 329-56.

Michel, H., 1999. Cytochrome *c* Oxidase: Catalytic Cycle and Mechanisms of Proton Pumping-A Discussion. *Biochemistry.* **38**: 15129-15140.

Mitchell, P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-148.

Mitchell, P., 1976. Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J. Theor. Biol.* **62**: 327-367.

Möller-Zinkhahn, D., Börner, G., Thauer, R. K., 1989. Function of methanofuran, tetrahydromethanopterin and coenzyme F₄₂₀ in *Archaeoglobus fulgidus*. *Arch. Microbiol.* **152**: 362-368.

Möller-Zinkhahn D. and Thauer R. K., 1990. Anaerobic lactate oxidation to 3 CO₂ by *Archaeoglobus fulgidus* via the carbon monoxide dehydrogenase pathway: demonstration of the acetyl-CoA carbon cleavage reaction in cell extracts. *Arch. Microbiol.* **153**: 215-218.

Mott, J. E., Grant, R. A., Ho, Y. S., Platt, T., 1985. Maximizing gene expression from plasmid vectors containing the lambda P_L promoter: strategies for overproducing transcription termination factor rho. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 88-92.

Moulis J.M., Meyer J., 1982. Characterization of the selenium-substituted 2 [4Fe-4Se] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry.* **21**: 4762-4771.

Müller, V., Blaut, M., Gottschalk, G., 1993. Bioenergetics of Methanogenesis. In: *Methanogenesis* (Ed.: Ferry, J.G.) Chapman & Hall, New York, USA. 360-406.

Müller, V., Blaut, M., Gottschalk, G., 1988. The transmembrane electrochemical gradient of Na⁺ as driving force for the methanol oxidation in *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **172**: 601-606.

Müller, V. und Gottschalk, G. 1992. The sodium ion cycle in acetogenic and methanogenic bacteria: Generation and utilization of a primary electrochemical sodium ion gradient. In: *Acetogenesis* (H. L. Drake ed.), Chapman & Hall, New York, USA. 127-156.

Müller, V., Ruppert, C., Lemker, T., 1999. Structure and function of the A₁A₀-ATPases from methanogenic *Archaea*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**: 15-27.

Muller F., 1983. The flavin redox-system and its biological function. *Top Curr Chem.* **108**: 71-107.

Munnich A., Rustin .P, Rotig A., Chretien D., Bonnefont J.P., Nuttin C., Cormier V., Vassault A., Parvy .P, Bardet J., 1992. Clinical aspects of mitochondrial disorders. *J Inherit. Metab. Dis.* **15**: 448 - 455.

Naviaux R.K., 2000. Mitochondrial DNA disorders. *Eur J Pediatr.* **159**: 219-226.

Ohnishi, T., 1998. Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim. Biophys. Acta.* **1364**: 186-206.

Okun J.G., Lümnen P., Brandt U., 1999. Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase). *J Biol Chem.* **274**: 2625-30.

Oostra R. J., Van Galen M. J., Bolhuis P. A, Bleeker- Wagemakers E. M., Van den Bogert C., 1995. The mitochondrial DNA mutation ND6*14,484C associated with leber hereditary optic neuropathy, leads to deficiency of complex I of the respiratory chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**: 1001 - 1005.

Orth M., Schapira A.H.V., 2001. Mitochondria and degenerative disorders. *Am. J. Med. Genet. (Sem Med Genet)* **106**.

Palmer, G., Müller, F., Massey, V., 1971. in *Flavins and Flavoproteins* (Kamin, H., ed.), pp. 123 – 137, University Park Press, Baltimore.

Pearson, W. R. & Lipman, D. J., 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 2444-2448.

Peer, C. W., Painter, M. H., Rasche, M. E., Ferry J. G., 1994. Characterization of a CO:heterodisulfide oxidoreductase system from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* **176**: 6974-6979.

Peinemann S., Blaut M., Gottschalk G., 1989. ATP synthesis coupled to methane formation from methyl-CoM and H₂ catalyzed by vesicles of the methanogenic bacterial strain Gö1. *Eur J Biochem.* **186**: 175-80.

Peng G., Fritsch G., Zickermann V., Schagger H., Mentele R., Lottspeich F., Bostina M., Radermacher M., Huber R., Stetter KO., Michel H., 2003. Isolation, characterization and electron microscopic single particle analysis of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from the hyperthermophilic eubacterium *Aquifex aeolicus*. *Biochemistry.* **42**: 3032-3039.

Pfennig, G. N., Lippert, K. D., 1966. Über das Vitamin B₁₂-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Arch. Microbiol.* **55**: 245-256.

Prieur I., Lunardi J., Dupuis A., 2001. Evidence for quinone binding site close to the interface between NuoD and NuoB subunits of complex I. *Biochem. Biophys. Acta* **1504**: 173-178.

Pulkes T., Eunson L., Patterson V., Siddiqui A., Wood N. W., Nelson I. P., Morgan-Hughes J. A., Hanna M. G., 1999. The mitochondrial DNA G13513A transition in ND5 is associated with a LHON/MELAS overlap syndrome and may be a frequent cause of MELAS. *Ann. Neurol.* **46**: 916 - 919.

Raha S., Robinson B.H., 2001. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am. J. Med. Genet.* **106**: 62-70.

Rasche M.E., Smith K.S., Ferry J.G., 1997. Identification of cysteine and arginine residues essential for the phosphotransacetylase from *Methanosarcina thermophila*. *J Bacteriol.* **179**: 7712-7717.

Rasmussen, T., Scheide, D., Brors, B., Kintscher, L., Weiss, H., Friedrich, T., 2001. Identification of two tetranuclear FeS clusters on the ferredoxin-type subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochemistry.* **40**: 6124-6131.

Raybuck S.A., Ramer S.E., Abbanat D.R., Peters J.W., Orme-Johnson W.H., Ferry J.G., Walsh C.T., 1991. Demonstration of carbon-carbon bond cleavage of acetyl coenzyme A by using isotopic exchange catalyzed by the CO dehydrogenase complex from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. J. Bacteriol. **173**: 929-932.

Reed D.W., Hartzell P.L., 1999. The *Archaeoglobus fulgidus* D-lactate dehydrogenase is a Zn(2+) flavoprotein. J. Bacteriol. **181**: 7580-7587.

Reeve J.N., Beckler G.S., 1990. Conservation of primary structure in prokaryotic hydrogenases. FEMS Microbiol Rev. **7**: 419-424.

Reeve J.N., 1992. Molecular biology of methanogens. Annu Rev Microbiol. **46**: 165-191.

Robinson B.H., 1998. Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. Biochim. Biophys. Acta. **1364**: 271-286.

Robinson B.H., 2001. Fuzzy logic in mitochondrial locomotion. Pediatr Res. **49**: 139.

Rosa, M. D., 1979. Four T7 RNA polymerase promoters contain an identical 23 bp sequence. Cell **16**: 815-825.

Roth A., Fritz G., Buchert T., Huber H., Stetter K.O., Ermler U., Kroneck P.M., 2000. Crystallization and preliminary X-ray analysis of adenylylsulfate reductase from *Archaeoglobus fulgidus*. Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. **12**: 1673-1675.

Sambongi Y., Iko Y., Tanabe M., Omote H., Iwamoto-Kihara A., Ueda I., Yanagida T., Wada Y., Futai M., 1999. Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F₀F₁): direct observation. Science. **286** 1722-1724.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T., 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.

Sauter M., Böhm R., Böck A., 1992. Mutational analysis of the operon (*hyc*) determining hydrogenase 3 formation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**:1523-1532.

Sazanov L. A., Burrows P. A., Nixon P. J., 1998. The plastid *ndh* genes code for an NADH-specific dehydrogenase: Isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 1319-1324.

Sazanov, L. 2002. 12th EBEC Short Report, **201**.

Sauer, K., Thauer, R. K., 1999. Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri* -- substitution of the corrinoid harbouring subunit MtaC by free cob(I)alamin. *Eur. J. Biochem.* **261**: 674-681.

Schlegel, H. G., 1992. *Allgemeine Mikrobiologie*. 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.

Schmidt, H., 2002. Einfluß von Hemmstoffen und verschiedenen Elektronenakzeptoren auf die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase. Diplomarbeit, Universität Göttingen.

Schmitz R. A., Linder D., Stetter K. O. and Thauer R. K., 1991. N⁵,N¹⁰-methylenetetrahydromethanopterin reductase (coenzyme F₄₂₀-dependent) and formylmethanofuran dehydrogenase from the hyperthermophilic *Archaeoglobus fulgidus*. *Arch. Microbiol.* **156**: 427-434.

Schuelke M., Smeitink J., Mariman E., Loeffen J., Plecko B., Trijbels F., Stockler-Ipsiroglu S., van den Heuvel L., 1999. Mutant NDUFV1 subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy. *Nat. Genet.* **21**: 260 - 261.

Schuler F., Casida J. E. 2001. Functional coupling of PSST and ND1 subunits in NADH:ubiquinone oxidoreductase established by photoaffinity labeling. *Biochim. Biophys. Acta* **1506**: 79-87.

Schulte U., Abelmann A., Amling N., Brors B., Friedrich T., Kintscher L., Rasmussen T., Weiss H., 1998. Search for novel redox groups in mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) by diode array UV/VIS spectroscopy. *Biofactors.* **8**: 177-186.

Setzke, E., Hedderich, R., Heiden, S., Thauer, R. K., 1994. H₂:heterodisulfide oxidoreductase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Eur. J. Biochem. **220**: 139-148.

Simianu, M., Murakami, E., Brewer, J. M., Ragsdale, S. W., 1998. Purification and properties of the heme and iron-sulfur containing heterodisulfide reductase from *Methanosarcina thermophila*. Biochemistry. **37**: 10027-10039.

Smith, D. R., Doucette-Stamm, L. A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicaire, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., Reeve, J. N., 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. J. Bacteriol. **179**: 7135-7155.

Sorgenfrei, O., Müller, S., Pfeiffer, M., Sniezko, I., Klein, A., 1997. The [NiFe] hydrogenases of *Methanococcus voltae*: genes, enzymes and regulations. Arch. Microbiol. **167**: 189-195.

Spehr V., Schlitt A., Scheide D., Guenebaut V., Friedrich T., 1999. Overexpression of the *Escherichia coli nuo*-operon and isolation of the overproduced NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). Biochemistry. **38**: 16261-16267.

Sperling, D., Kappler, U., Truper, H.G., Dahl, C., 2001. Dissimilatory ATP sulfurylase from *Archaeoglobus fulgidus*. Methods Enzymol. **331**: 419-427.

Stetter, K. O., Lauerer, G., Thomm, M., Neuner, A., 1987. Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers: evidence for a novel branch of archaeobacteria. Science **236**: 822-824.

Stetter K. O., 1988. *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov.: a new taxon of extremely thermophilic archaeobacteria. System. Appl. Microbiol. **10**: 172-173.

Steuber J., 2001 The Na⁺-translocating NADH:quinone oxidoreductase (NDH I) from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*: implications for the mechanism of redox-driven cation translocation by complex I. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**: 179-86.

Studier, F. W., Moffatt, B. A., 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.

Terlesky K.C., Ferry J.G., 1988. Ferredoxin requirement for electron transport from the carbon monoxide dehydrogenase complex to a membrane-bound hydrogenase in acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *J Biol Chem.* **263**: 4075-4079.

Thauer, R. K., 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiol.* **144**: 2377-2406.

Thauer, R. K., 1999. Structure and funktion of the nickel enzyme methyl-coenzyme M reductase. *J. Inorg. Biochem.* **74**: 45-54

Thauer, R. K., Hedderich, R., Fischer, R., 1993. Reactions and enzymes involved in methanogenesis from CO₂ and H₂. In: Ferry, J.G. (ed.) *Methanogenesis*. Chapman & Hall, New York, London, 209-252.

Tindall, B. J., Stetter, K. O., Collins, M. D., 1989. A Novel, Fully Saturated Menaquinone from the thermophilic, sulphate-reducing Archaeobacterium *Archaeoglobus fulgidus*. *3. Gen. Microbiol. ILS*, 693-696.

Triepels R.H., van den Heuvel L. P., Loeffen J. L., Buskens C.A., Smeets R. J., Rubio Gozalbo M. E., Budde S. M., Mariman E. C., Wijburg F. A., Barth P. G., Trijbels J. M., Smeitink J. A., 1999. Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUFS7 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I. *Ann Neurol.* **45**: 787-790.

Triepels R. H, Van Den Heuvel L. P, Trijbels J. M, Smeitink J. A., 2001 Respiratory chain complex I deficiency. *Am J Med Genet. Spring* **106**: 37-45.

van der Meijden P., Heythuysen H. J., Pouwels A., Houwen F., van der Drift C., Vogels G. D., 1983. Methyltransferases involved in methanol conversion by *Methanosarcina barkeri*. Arch. Microbiol. **134**: 238-42.

Vogelstein, B., Gillespie, D., 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 615-619.

Vorholt, J., Kunow, J., Stetter, K. O., Thauer, R. K., 1995. Enzymes and coenzymes of the carbon monoxide dehydrogenase pathway for autotrophic CO₂-fixation in *Archaeoglobus lithotrophicus* and the lack of carbon monoxide dehydrogenase in the heterotrophic *A. profundus*. Arch. Microbiol. **163**: 112-118.

Vorholt, J. A., Vaupel, M., Thauer, R. K., 1996. A polyferredoxin with eight [4Fe-4S] clusters as a subunit of molybdenum formylmethanofuran dehydrogenase from *Methanosarcina barkeri*. Eur. J. Biochem. **236**: 309-317.

Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., Fontecilla-Camps, J. C., 1995. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. Nature. **373**: 580-587.

Walsh, C., 1986. Naturally occurring 5-deazaflavin coenzymes: Biological redox roles. Acc.Chem.Res. **19**: 216-221

Weber K., Osborn M., 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J Biol Chem. **244**: 4406-4412.

Weidner, U., Geier, S., Ptock, A., Friedrich, T., Leif, H., Weiss, H., 1993. The gene locus of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*: organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of mitochondrial complex I. J. Mol. Biol. **233**: 109-122.

Weiss H., Friedrich T., Hofhaus G., Preis D., 1991. The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. Eur J Biochem.**197**: 563-76.

Westenberg D. J., Braune A., Ruppert C., Muller V., Herzberg C., Gottschalk G., Blaut M., 1999. The F₄₂₀H₂-dehydrogenase from *Methanobolus tindarius*: cloning of the *ffd* operon and expression of the genes in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett **170**: 389-398.

Wettach, J., Gohl, H. P., Tschochner, H., Thomm, M., 1995. Functional interaction of yeast and human TATA binding proteins with an archael RNA-polymerase and promotor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 472-476.

Whitby, L.G. 1953. Biochem. J. 54: 437-445

Whitman, W. B., Ankwanda, E., Boone, D. R., 1991. The methanogenic bacteria, In: The Prokaryotes, Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.J. (eds.), pp. 719-767, Springer Verlag, New York.

Woese, C. R., Kandler, O. W., Wheelis, M. L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, Bacteria, and Eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 4576-4579.

Woese C. R., Achenbach L., Rouviere P., Mandelco L., 1991. Archaeal phylogeny: reexamination of the phylogenetic position of *Archaeoglobus fulgidus* in light of certain composition-induced artifacts. Syst. Appl. Microbiol. **14**: 364-371.

Wolin, E. A., Wolfe, R. R., Wolin, M. J., 1964. Viologen dye inhibition of methane formation by *Methanobacterium omelanskii*. J. Bacteriol. **87**: 993-998.

Wolfe, R. S., 1985. Unusual coenzymes of methanogenesis. TIBS. **10**: 396-399.

Xia D., Yu C.A., Kim H., Xia J.Z., Kachurin A.M., Zhang L., Yu L., Deisenhofer J., 1997. Crystal structure of the cytochrome *bc*₁ complex from bovine heart mitochondria. Science. **277** : 60-66.

Yagi, A. M., Yagi, T., 2001. Complex I An L-Shaped Black Box
Journal of Bioenergetics and Biomembranes. **33**: 155-157

Yagi, T., 1993. The bacterial energy-transducing NADH-quinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* **8**: 1-17.

Yagi T., Yano T., Di Bernardo S., Matsuno-Yagi A., 1998. Procaryotic complex I (NDH-1), an overview. *Biochim. Biophys. Acta.* **1364** :125-133.

Yagi T, Yagi A. M., 2003. The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. *Biochemistry.* **42**: 2266-74.

Yano, T., Sled, V. D., Onishi, T., Yagi, T., 1994. Identification of amino acid residues associated with the [2Fe-2S] cluster of the 25 kDa (NQO2) subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Lett.* **354**: 160-164.

Yano, T., Sled, V. D., Onishi, T., Yagi, T., 1996. Expression and Characterisation of the Flavoprotein Subcomplex Composed of 50-kDa (NQO1) and 25-kDa (NQO2) Subunits of the Proton-translocating NADH-Quinone Oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans* . *J. Biol. Chem.* **271**: 5907-5913.

Yano T., Chu S. S., Sled V. D., Ohnishi T., Yagi T., 1997. The proton-translokating NADH-quinone oxidoreduktase (NDH-1) of thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB-8. *J. Biol. Chem.* **274**: 28606-28611.

Yano T, Magnitsky S, Sled' VD, Ohnishi T, Yagi T. 1999. Characterization of the putative 2x[4Fe-4S]-binding NQO9 subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase (NDH-1) of *Paracoccus denitrificans*. Expression, reconstitution, and EPR characterization. *J Biol Chem.* **274**: 28598-605.

Yano, T., Magnitsky S., Onishi, T., 2000. Characterization of complex I-associated ubiquinone species: towards the understandig of their roles in the electron/proton transfer reaction. *Biochim. Biophys. Acta.* **1459**: 299-304.

Yano, T., Ohnishi, T., 2001. The origin of cluster N2 of the energy-transducing NADH-quinone oxidoreductase: comparisons of phylogenetically related enzymes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2001 **33**: 213-222.

Zehnder, A. J. B., Wuhrmann, K., 1976. Titan(III)citrate a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. *Science* **194**: 1165-1166.

Zellner G, Stackebrand, E., kneifel, H., Messner, P., Sleytr, U.B., Conway De Macario, E., Zabel, H.P., Stetter, K.O., Winter, J., 1989. Isolation of a Thermophilic, Sulfate Reducing Archaeobacterium, *Archaeoglobus fulgidus* Strain Z. *System. Appl. Microbiol.* **11**: 151-160.

Zillig, W., Stetter, K. O., Schnabel, R., Madou, J., Gierl, A., 1982. Transkription in Archaeobacteria. *Zbl. Bakt. Hyg. 1 Abt. Orig.* **C3**: 218-227.

Zinder, S. H.,1993. Physiological ecology of methanogens. In: Ferry, J.G. (ed.), *Methanogenesis*, Chapman & Hall, New York-London 128-206.


```

FpoO Ms.mazei      MTD(*)DL(*)CGKGIPTVIVR(*)TY(*)PPL(*)RFAY(*)PEGV(*)WKGL(*)CE(*)TCL(*)DSAQ(*)KTY(*)LEV(*)NRN(*)H(*)TS(*)CR(*)R
FpoO Ms.acetivorans MTD(*)DL(*)CGKAIPTVIVR(*)VIR(*)PPL(*)KFAY(*)PNGV(*)WKGL(*)CE(*)TCL(*)DSAQ(*)KTY(*)LEV(*)NKN(*)QPS(*)CR(*)K
FpoO Ms.barkeri    MTD(*)DL(*)CGRALPSVIVR(*)VFR(*)SRL(*)KFAY(*)PEGI(*)WKGL(*)CE(*)ACL(*)DSAQ(*)E(*)TY(*)LS(*)INK(*)DEI(*)SR(*)R
*****:.:*.*****. . *:*****:*.*****:*****:***.:*:. . ***:

FpoO Ms.mazei      GK(*)CS(*)LC(*)GSKTGV(*)FSVEL(*)QIP(*)DFSK(*)GIV(*)RKD(*)VDV(*)CY(*)RCL(*)KL(*)VDEAY(*)IR(*)YK(*)RE(*)QIE(*)QD(*)HE(*)QG
FpoO Ms.acetivorans GK(*)CAL(*)CGDKTGV(*)FPVEL(*)QVP(*)DFSK(*)GIV(*)KKD(*)VDL(*)CY(*)RCL(*)KG(*)VDEAY(*)IR(*)HK(*)KE(*)QIEM(*)EH(*)GY(*)H
FpoO Ms.barkeri    NK(*)CVL(*)CGKKGRV(*)YPVEI(*)QIP(*)DFSK(*)GV(*)IK(*)VNV(*)CT(*)KL(*)DSIN(*)E(*)TY(*)IR(*)FK(*)RE(*)QIE(*)GS(*)VCE(*)H
. ** ***. * *:*****: * *.*:* :** . :*:***.*:***.

FpoO Ms.mazei      RIHGHEHVHPH
FpoO Ms.acetivorans -----
FpoO Ms.barkeri    GHGNVPEH---

```

Anhang II: Aminosäure-Alignment der O-Untereinheiten der F₄₂₀H₂-Dehydrogenasen: FpoO aus *Ms. mazei* Gö1, *Ms. acetivorans* und *Ms. barkeri*.

(*) Identität

(:) starke Ähnlichkeit

(.) schwache Ähnlichkeit

grau unterlegt sind die in allen Untereinheiten konservierten Bindemotive der Eisen-Schwefel-Zentren. Für das Alignment wurde das Programm

CLUSTALW (<http://clustalw.genome.ad.jp/>) verwendet.

Danksagungen

Herrn Priv. Doz. Dr. U. Deppenmeier danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seinem steten Interesse am Fortgang der Arbeit und für die Möglichkeit zum selbständigen wissenschaftlichen Arbeiten. Besonderer Dank gilt ihm für die intensive und gewissenhafte Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. G. Gottschalk danke ich für die Bereitschaft sich als Korreferent zur Verfügung zu stellen.

Herrn Prof. Dr. R. Ficner und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Unterstützung bei den Kristallisationsexperimenten.

Bei Herrn Prof. Dr. T. Friedrich möchte ich mich in dieser Form für die Hilfe bei der Aufnahme der EPR-Spektren bedanken.

Besonderer Dank gilt den ehemaligen und derzeitigen MitarbeiterInnen des Labors 206 (Sabine Lentes, Tina Prust, Sonja Voget, Sonja Volland, Sebastian Bäumer, Frank Falinski, Marc Hoffmeister, Raymond Hovey, Hauke Schmidt, Thomas Lehmann, Marcell Grapp) für die sehr nette Arbeits-Atmosphäre.

Für die Korrekturarbeiten sei ganz herzlich Marc, Tina und Elke gedankt und Martin danke ich für die Unterstützung beim Drucken.

Den Mitgliedern der Werkstatt danke ich für die schnelle Hilfe bei allen anfallenden technischen Problemen.

Weiterhin bedanke ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

Lebenslauf

19. Januar 1970	geboren in Ziegenhain
1976 - 1980	Grundschule Oberaula
1980 - 1986	Gesamtschule Steinwaldschule Neukirchen
Juni 1986	Realschulabschluss
1986 - 1989	Ausbildung zum Molkereifachmann in den Milchwerken Fulda-Lauterbach eG
Juli 1989	Erfolgreiche Abschlussprüfung im Ausbildungsberuf Molkereifachmann
1989 - 1992	Berufliches Gymnasium Max-Eyth-Schule, Alsfeld
Juni 1992	Abitur
1992 - 1993	Zivildienst im Altenpflegeheim Rambachhaus, Alsfeld
Oktober 1993	Immatrikulation an der Georg-August-Universität in Göttingen für das Fach Biologie
Oktober 1995	Vordiplom in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie, Chemie und Physikalische Chemie
März 2000	Diplom in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie und Physikalische Chemie Die Diplomarbeit trug den Titel: „Molekularbiologische Charakterisierung des <i>nlpD</i> -Gens aus <i>Rhizobium meliloti</i> “
April 2000	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation