

**Substratumsetzung und Schutz
vor Sauerstoffradikalen in
*Methanosarcina mazei***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Christian Krätzer

aus

Siegen

Bonn, 2011

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier
2. Gutachterin: apl. Prof. Dr. Christiane Dahl

Tag der Promotion: 20.04.11

Erscheinungsjahr: 2011

Meinem Vater Ulrich Krätzer

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Der zentrale Stoffwechselweg der Methanogenese	1
1.2	Prokaryonten und reaktive Sauerstoff-Verbindungen	3
1.3	Thematik dieser Arbeit	6
2.	Material und Methoden	7
2.1	Chemikalien und Materialien	7
2.1.1	Gase	7
2.1.2	Chemikalien	7
2.1.3	Enzyme und Proteine	7
2.1.4	Kits	8
2.2	Organismen, Vektoren, Plasmide und Oligonukleotide	8
2.2.1	Organismen	8
2.2.2	Plasmide und Vektoren	9
2.2.3	Oligonukleotide	10
2.3	Mikrobiologische Methoden	11
2.3.1	Zellanzucht von <i>Ms. mazei</i> in Flüssigmedium	11
2.3.2	Zellanzucht von <i>Ms. mazei</i> auf festem Medium	11
2.3.3	Stammkulturhaltung von <i>Ms. mazei</i>	12
2.3.4	Stammkulturhaltung von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	12
2.3.5	Luria Bertani- (LB-) Medium	12
2.3.6	MI (maximale Induktion) -Medium	12
2.3.7	<i>Methanosarcina</i> -Komplexmedium	13
2.3.7.1	Vitaminlösung, 10 x konzentriert	14
2.3.7.2	Spurenelementlösung SL6, 10 x konzentriert	14
2.3.8	Bestimmung des Wachstums von <i>E. coli</i> und <i>Ms. mazei</i>	14
2.3.9	Ermittlung von Wachstumsparametern	14

2.4	Molekularbiologische Methoden	15
2.4.1	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>Ms. mazei</i> , modifiziert	15
2.4.2	Präparation von Plasmid-DNA	15
2.4.3	Reinigung von PCR-Produkten	15
2.4.4	Isolierung von RNA	15
2.4.5	Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA	15
2.4.6	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	16
2.4.7	Synthese von cDNA	16
2.4.8	Real-Time quantitative reverse Transkriptions-PCR	16
2.4.8.1	qRT-PCR des Operons <i>mmdx – mm0636</i>	17
2.4.8.2	qRT-PCR der Methyltransferasegene	17
2.4.9	Enzymatische Modifikation von DNA	18
2.4.9.1	Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	18
2.4.9.2	Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase	18
2.4.9.3	Ligation von DNA-Fragmenten	18
2.4.10	Visualisierung von DNA	19
2.4.11	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	19
2.4.12	Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitze-Schock	20
2.4.13	Liposomen-vermittelte Transformation von <i>Ms. mazei</i>	20
2.4.14	Generierung einer Knockout-Mutante von <i>Ms. mazei</i>	20
2.5	Biochemische Methoden	21
2.5.1	Produktion von Proteinen	21
2.5.1.1	Heterologe Proteinproduktion	21
2.5.1.2	Anaerobe heterologe Proteinproduktion	22
2.5.1.3	Produktion von MM0633 in <i>Wolinella succinogenes</i>	22
2.5.1.4	Produktion von Proteinen aus <i>Clostridium acetobutylicum</i>	22
2.5.2	Zellaufschluss	23
2.5.2.1	Zellaufschluss durch Ultraschall	23

2.5.2.2	Zellaufschluss durch French-Press	23
2.5.2.3	Zellaufschluss durch Lysepuffer	23
2.5.3	Reinigung von Proteinen	23
2.5.3.1	Proteinreinigung unter anaeroben Bedingungen	24
2.5.3.2	Reinigung von Ferredoxin aus <i>Clostridium pasteurianum</i>	24
2.5.4	Präparation der Membranfraktion von <i>Ms. mazei</i>	24
2.5.5	Detektion von Proteinen	25
2.5.5.1	Proteinbestimmung nach Bradford	25
2.5.5.2	Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure	25
2.5.5.3	Proteinbestimmung über die Absorption bei 280 nm	25
2.5.5.4	Diskontinuierliche SDS-PAGE	26
2.5.5.5	Silberfärbung	27
2.5.5.6	Häm-Färbung von Cytochromen	28
2.5.5.7	Western-Blot	28
2.5.6	Einengen und Entsalzen von Proteinen	29
2.5.7	Rekonstitution von Proteinen	29
2.5.7.1	Rekonstitution von MM0632	29
2.5.7.2	Rekonstitution von MM0636	29
2.5.8	Gelfiltrationsanalyse von Proteinen	30
2.5.9	Herstellung einer Kaliumsuperoxid-Lösung	30
2.5.10	Enzymtests	30
2.5.10.1	MM0631: Disulfid-Reduktase-Aktivität	30
2.5.10.2	MM0632: Cytochrom <i>c</i> -Test	31
2.5.10.3	MM0632: Rubredoxin-Oxidase-Aktivität	32
2.5.10.4	MM0632: Detektion der Wasserstoffperoxid-Bildung	32
2.5.10.5	MM0632: Superoxid-Dismutase-Aktivität	33
2.5.10.6	MM0633: Test mit Hydroxy-Phenazin	33
2.5.10.7	MM0633: Test mit Membranen und alternativen Elektronenakzeptoren	33

2.5.10.8	MM0633, MM0634, MM0635: Reduktion durch Ferredoxin:NADP ⁺ -Oxidoreduktase	33
2.5.10.9	MM0634 und MM0635: Reduktion durch CO-Dehydrogenase	34
2.5.11	Analyse der Kofaktoren von Proteinen	34
2.5.11.1	Eisenbestimmung	34
2.5.11.2	Schwefelbestimmung	34
2.5.11.3	Flavinbestimmung	35
2.5.11.4	Flavin-Präparation	35
2.5.11.5	Quantifizierung von Flavin-Kofaktoren	35
2.5.11.6	Kofaktorbestimmung mittels HPLC	36
2.5.12	Chemischer Nachweis von TMA, DMA und MMA	36
2.6	Bioinformatische Methoden	37
3.	ERGEBNISSE	38
3.1	Untersuchungen zur Substratumsetzung in <i>Methanosarcina mazei</i>	38
3.1.1	Analyse des TMA-Verbrauchs und der DMA- und MMA-Bildung von wachsenden Zellen	40
3.1.2	Analyse des Transkriptionsprofils der Methyltransferase-Gene	41
3.2	Untersuchungen zum Gencluster <i>mm0629 – mm0636</i> und der korrespondierenden Proteine als potentielle Schutzfaktoren vor Sauerstoffradikalen in <i>Ms. mazei</i>	45
3.2.1	Transkriptionsanalyse des Operons <i>mm0629 – mm0636</i>	45
3.2.2	Untersuchung des Proteins MMDx	48
3.2.2.1	Sequenzvergleich von MMDx	48
3.2.2.2	Charakterisierung des rekombinanten Proteins MMDx	50
3.2.3	Untersuchung des Proteins MM0631	54
3.2.3.1	Sequenzvergleich von MM0631	54
3.2.3.2	Charakterisierung des rekombinanten Proteins MM0631	55
3.2.4	Untersuchung des Proteins MM0632	60

3.2.4.1	Sequenzvergleich von MM0632	60
3.2.4.2	Charakterisierung des rekombinanten Proteins MM0632	63
3.2.4.3	Superoxid-Reduktase-Aktivität von MM0632	68
3.2.4.4	Nachweis von Wasserstoffperoxid	75
3.2.4.5	Regulation des Operons <i>mmdx</i> – <i>mm0636</i> nach Sauerstoffschock	75
3.2.5	Untersuchung des Proteins MM0633	78
3.2.5.1	Produktion und biochemische Analyse von Protein MM0633	81
3.2.5.2	Erzeugung und Charakterisierung einer <i>mm0633</i> -Deletionsmutante von <i>Ms. mazei</i>	87
3.2.6	Charakterisierung des Proteins MM0634	90
3.2.6.1	Sequenzvergleich von MM0634	90
3.2.6.2	Charakterisierung des rekombinanten Proteins MM0634	92
3.2.7	Untersuchungen zum Protein MM0635	96
3.2.7.1	Sequenzvergleich von MM0635	96
3.2.7.2	Charakterisierung des rekombinanten Proteins MM0635	98
3.2.8	Untersuchungen zum Protein MM0636	103
3.2.8.1	Sequenzvergleich von MM0636	103
3.2.8.2	Charakterisierung des rekombinanten Proteins MM0636	103
4.	DISKUSSION	107
4.1	Die Funktion von Methyltransferasen in <i>Ms. mazei</i>	107
4.2	Untersuchung der Gene und Genprodukte des Operons <i>mmdx</i> – <i>mm0636</i>	111
4.2.1	Untersuchung der Struktur und Regulation des Operons	112
4.2.2	Bioinformatische Analyse der Proteine MM0629 und MM0630	114
4.2.3	Charakterisierung von MM0631	114
4.2.4	Die Funktion von Protein MM0632 als Superoxid-Reduktase im Stoffwechsel von <i>Ms. mazei</i>	118

4.2.4.1	Analyse der Aminosäuresequenz und Identifizierung eines [4Fe-4S]-Clusters in MM0632	118
4.2.4.2	Superoxid-Reduktase-Aktivität von Methanoferrodoxin	122
4.2.5	Identifizierung von Desulforedoxin als nativer Elektronendonator von Methanoferrodoxin	123
4.2.5.1	Produktion von Desulforedoxin und Aktivitätsmessung	123
4.2.5.2	Analyse der Aminosäuresequenz von Desulforedoxin	123
4.2.6	Das [4Fe-4S]-Cluster von Methanoferrodoxin	124
4.2.7	Charakterisierung des Proteins MM0636	126
4.2.8	Homologe Gene von <i>mmdx</i> – <i>mm0636</i> in anderen methanogenen <i>Archaea</i>	128
4.2.9	Suche nach dem nativen Elektronendonator von Desulforedoxin aus <i>Ms. mazei</i>	131
4.2.10	Beteiligung der Proteine MMDx – MM0636 in der zellulären Verteidigung gegen Sauerstoff und Sauerstoffradikale	133
4.2.11	Eigenschaften des Proteins MM0633 aus <i>Ms. mazei</i>	134
4.2.12	Eigenschaften der Proteine MM0634 und MM0635	137
5.	ZUSAMMENFASSUNG	140
6.	LITERATURVERZEICHNIS	142
	PUBLIKATIONSLISTE	152

Abkürzungsverzeichnis

A

A. dest. Demineralisiertes Wasser

Amp Ampicillin

B

Bp Basenpaar

BSA Bovines Serumalbumin

C

CO Kohlenstoffmonoxid

CoB / Coenzym B 7-Mercaptoheptanoyl-threoninphosphat

CoM / Coenzym M 2-Mercaptoethansulfonat

C-Terminus Carboxyterminus

cDNA Copy Desoxyribonukleinsäure

D

DMA Dimethylamin

DMSO Dimethylsulfoxid

DTE Dithioerythritol

E

et al. Und andere

F

FAD Flavinadenindinukleotid

FMN Flavinadeninmononukleotid

F₄₂₀ / Kofaktor F₄₂₀ 8-Hydroxy-5-Deazaflavin

K

kDa Kilo Dalton

KP-Puffer Kaliumphosphat-Puffer

kPa Kilopascal

kb Kilobasenpaar

P

Psi Pound-force per square inch

L

LB Luria Bertani

M

MeOH Methanol

min Minute

MMA Monomethylamin

M Molekülmasse

N

N-Terminus Aminoterminus

NAD Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid

NADP Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

O

OD Optische Dichte

P

PCR Polymerasekettenreaktion

R

RT Raumtemperatur

S

sek Sekunden

SOD Superoxid-Dismutase

SOR Superoxid-Reduktase

T

TMA Trimethylamin

TRIS Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TEMED Tetramethylendiamin

U

U Unit

V/W

w/v Gewicht pro Volumen

v/v Volumen pro Volumen

X

XO Xanthin-Oxidase

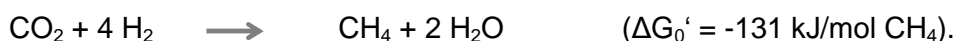
1. Einleitung

Die Gruppe der *Archaea* wurde 1977 als zweite Domäne der Prokaryonten neben den Bakterien klassifiziert (202). Seit der im Jahr 1990 vorgenommenen Einteilung der *Archaea* in die Phyla *Euryarchaeota* und *Crenarchaeota* wurden zahlreiche neue Arten entdeckt und mehrere neue Linien beschrieben (30, 81, 203). Während die zuerst isolierten Arten vornehmlich aus extremen Habitaten isoliert wurden, ist heute klar, dass *Archaea* ubiquitär verbreitet sind und in vielen extremophilen aber auch mesophilen Ökosystemen vorkommen (39).

Eine sehr diverse Gruppe der Euryarchaeota wird nach dem Endprodukt ihres Metabolismus, dem Methan, als methanogene *Archaea* bezeichnet. Diese Gruppe umfasst die Ordnungen *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanocellales* und *Methanosarcinales*. Die meisten methanogenen Organismen können ausschließlich H₂ und CO₂ oder Formiat als Substrate verwerten, sie werden daher auch als hydrogenotrophe Methanogene bezeichnet. Für die Ordnung *Methanosarcinales* ist eine methylotrophe Wachstumsweise mit methylierten C₁-Verbindungen wie TMA und Methanol, und die acetiklastische Wachstumsweise mit Acetat charakteristisch (56). Acetiklastische methanogene *Archaea* sind für das Ökosystem von großer Bedeutung, denn Acetat ist das häufigste Endprodukt der bakteriellen Vergärung von organischem Material. Durch ihre Fähigkeit, unter anaeroben Bedingungen Acetat zu CO₂ und Methan umzusetzen, schließen die acetiklastischen methanogenen Organismen den Kohlenstoffkreislauf unter anaeroben Bedingungen, wenn alternative Elektronenakzeptoren wie Sulfat limitierend sind. Die Arten *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina barkeri* und *Methanosarcina thermophila* sind auf Grund ihrer metabolischen Vielseitigkeit als Modellorganismen sehr intensiv untersucht worden.

1.1 Der zentrale Stoffwechselweg der Methanogenese

Der zentrale Stoffwechselweg der Methanogenese ist allen methanogenen *Archaea* gemein und kann durch die folgende Formel beschrieben werden (56):



Formel 1: Summenformel der Methanogenese.

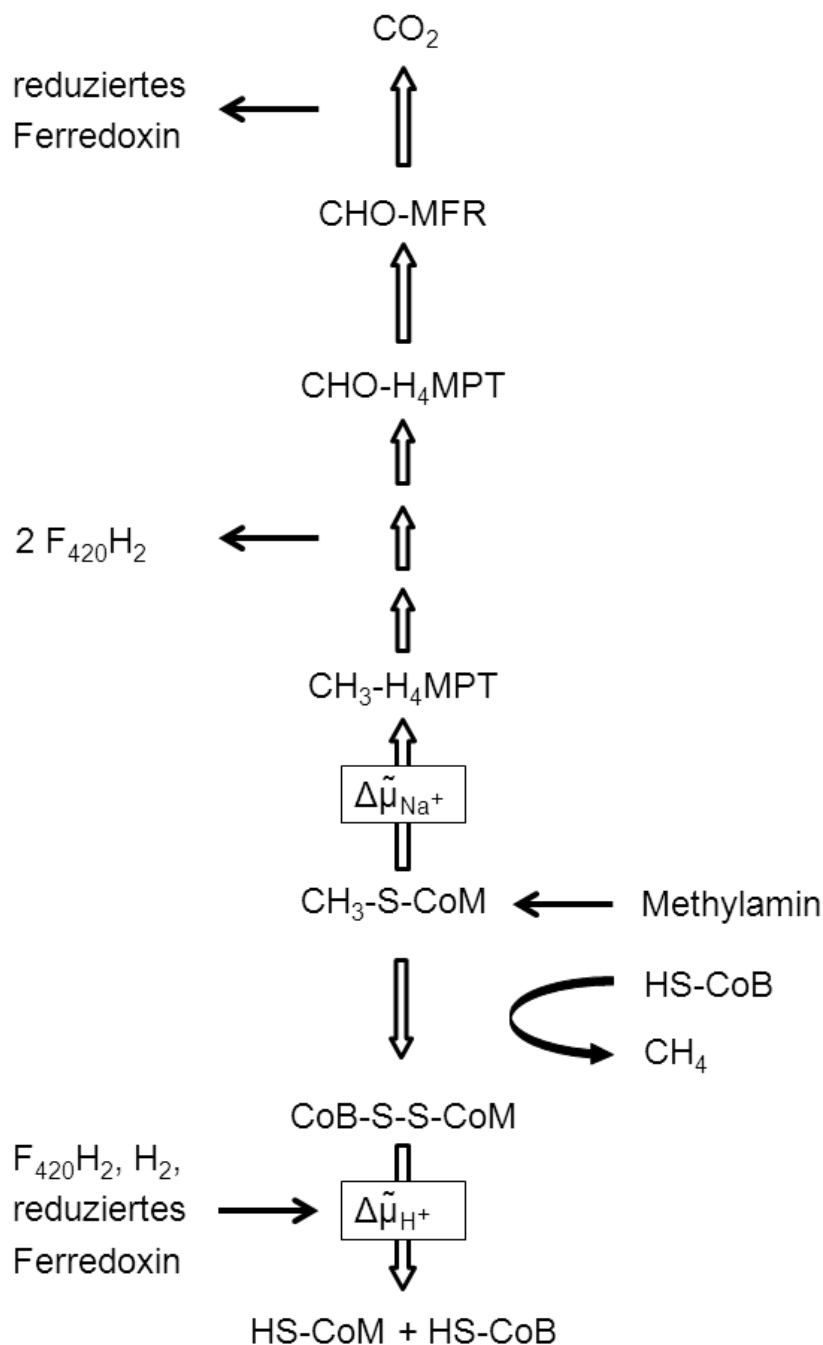


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Methanogenese mit TMA als Substrat. In Boxen sind der elektrochemische Natriumionen-Gradient ($\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$) und der elektrochemische Protonen-Gradient ($\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$) eingetragen. Bei Wachstum mit Methylaminen als Substrat wird der elektrochemische Natriumionen-Gradient durch den endergonen Methylgruppen-Transfer von CoM auf H_4MPT verbraucht. Der elektrochemische Protonen-Gradient wird durch die membrangebundene Atmungskette gebildet. MFR: Methanofuran, H_4MPT : Tetrahydromethanopterin, CoM: Coenzym M, CoB: Coenzym B.

Im Folgenden wird auf die Methanogenese mit Trimethylamin (TMA) als Substrat eingegangen. TMA ist ein Abbauprodukt von totem organischem Material und ist vor allem in marinen Ökosystemen weit verbreitet. In Abbildung 1 ist die Methanogenese bei Wachstum mit TMA dargestellt. Die Methylgruppen von TMA werden über ein Methyltransferase-System auf das Coenzym M übertragen. Von hier aus teilt sich der Stoffwechselweg in einen reduktiven und einen oxidativen Teil. Die Reduktion der Methylgruppe mit Coenzym B als Elektronendonator führt zu dem ersten Endprodukt, Methan, und dem Heterodisulfid aus Coenzym B und Coenzym M. Heterodisulfid ist der Elektronenakzeptor einer membrangebundenen Atmungskette, die Vertretern der Gattung *Methanosarcina* zur Energiegewinnung dient. Als Elektronendonatoren der Atmungskette werden H_2 , $F_{420}H_2$ sowie reduziertes Ferredoxin verwendet (55). Bei Wachstum auf TMA werden die Reduktionsäquivalente durch die Oxidation eines Teils der Methylgruppen zu CO_2 generiert. Der Methyltransfer von Methyl-Coenzym M auf H_4MPT ist ein endergoner Schritt und wird von einer membrangebundenen Methyltransferase katalysiert, die die nötige Energie aus einem elektrochemischen Natriumgradienten bezieht. Gebunden an H_4MPT wird die Methylgruppe über Methylen- und Methenyl- zur Formylgruppe oxidiert und die Reduktionsäquivalente auf F_{420} übertragen. $F_{420}H_2$ wird in *Ms. mazei* über die F_{420} -Dehydrogenase oxidiert und die Elektronen in die Atmungskette eingeschleust (200). Die Formylgruppe wird schließlich auf Methanofuran übertragen und zu CO_2 und H_2 oxidiert. Dieser Prozess ist exergon und generiert reduziertes Ferredoxin, das ebenfalls durch die Atmungskette regeneriert wird.

1.2 Prokaryonten und reaktive Sauerstoff-Verbindungen

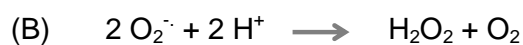
Sauerstoff kann ungehindert über Membranen in Zellen diffundieren und dort leicht mit prosthetischen Gruppen von Enzymen reagieren. Durch diese Reaktionen entstehen reaktive Sauerstoffverbindungen, die die eigentliche Gefahr für die Zelle darstellen. Zu den reaktiven Sauerstoffverbindungen gehören Radikalverbindungen, wie Superoxid und Hydroxyl-, Peroxyl- und Alkoxy-Radikale, sowie nicht-Radikale, darunter Wasserstoffperoxid, Ozon und Peroxinitrit. Reaktive Sauerstoff-Verbindungen sind chemisch äußerst aktiv und können zelluläre Bestandteile beschädigen, indem sie Fettsäuren, Zucker, DNA und Proteine modifizieren (133, 187).

Superoxid und Wasserstoffperoxid sind relativ stabile Moleküle, doch Superoxid ist in der Lage, weitere reaktive Sauerstoffverbindungen hervorzubringen. Der Transfer von einem Elektron auf molekularen Sauerstoff bildet das Superoxid-Radikal mit einem ungepaarten Elektron. Es existiert nur wenige Mikrosekunden und disproportioniert zu

molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid (11). Wasserstoffperoxid wiederum führt durch den Vorgang der Fenton-Reaktion zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen. Hierbei reagieren reduzierte Eisen- und Kupfer-Ionen von prosthetischen Gruppen mit Wasserstoffperoxid zu Hydroxyl-Radikalen, die chemisch äußerst reaktiv sind (65). Superoxid wird von einigen Flavin-haltigen Enzymen als Nebenprodukt der Reaktion mit Sauerstoff gebildet, wie bei der Xanthin-Oxidase (113, 135). Die Hauptquelle ist jedoch die unbeabsichtigte Auto-Oxidation von Flavin-haltigen Oxidoreduktasen. Auch der Elektronenverlust von Membranen ist bedeutend für die Generierung reaktiver Sauerstoff-Verbindungen (99). In *E. coli* wird 0,2 % des von den Zellen konsumierten Sauerstoffs zu Superoxid reduziert und 0,4 % zu Wasserstoffperoxid umgesetzt (96).

Prokaryonten können in aerobe, aerotolerante und anaerobe Organismen eingeteilt werden. Mikroorganismen mit einer aeroben Atmung sind von Sauerstoff abhängig, während aerotolerante Prokaryonten meist über Gärung Energie gewinnen. Aerobe und aerotolerante Prokaryonten haben sich durch Anpassung ihrer zellulären Maschinerie und durch Enzyme, die sie vor reaktiven Sauerstoffverbindungen schützen, der oxygenen Lebensweise bzw. an oxische Habitate angepasst. Auf anaerobe Organismen hingegen wirkt Sauerstoff toxisch und führt in bestimmten Konzentrationen zu einer Einstellung des Wachstums.

Prokaryonten haben verschiedene Enzyme entwickelt, die vor reaktiven Sauerstoff-Verbindungen schützen. Katalasen wandeln Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff um, während Superoxid-Dismutasen Superoxid zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff zersetzen (Formel 2). Beide Enzyme sind unter aeroben, aerotoleranten und anaeroben Organismen weit verbreitet (29).



Formel 2: (A) Summenformeln der Reaktionen der Katalase, (B) Summenformeln der Reaktionen der Superoxid-Dismutase.

Ein von diesen Enzymen grundsätzlich unterschiedliches Enzymsystem ist vornehmlich bei anaeroben Organismen wie Clostridien, Sulfat-reduzierenden δ -Proteobakterien und anaeroben *Archaea* beschrieben worden. Es nutzt Elektronen aus dem NADH-Pool der Zelle, um verschiedene reaktive Sauerstoffverbindungen zu eliminieren. Eine NADH-Oxidase überträgt in diesem System Elektronen auf Rubredoxin (Abbildung 2). Rubredoxin dient als Elektronendonator für Rubrerythrin, Superoxid-Reduktase und Flavoproteine, die die Zelle vor reaktiven Sauerstoff-Verbindungen schützen.

Rubrerythrin beseitigt Wasserstoffperoxid, Superoxid-Reduktasen Superoxid und die Flavoproteine molekularen Sauerstoff (89, 129, 163-165, 199).

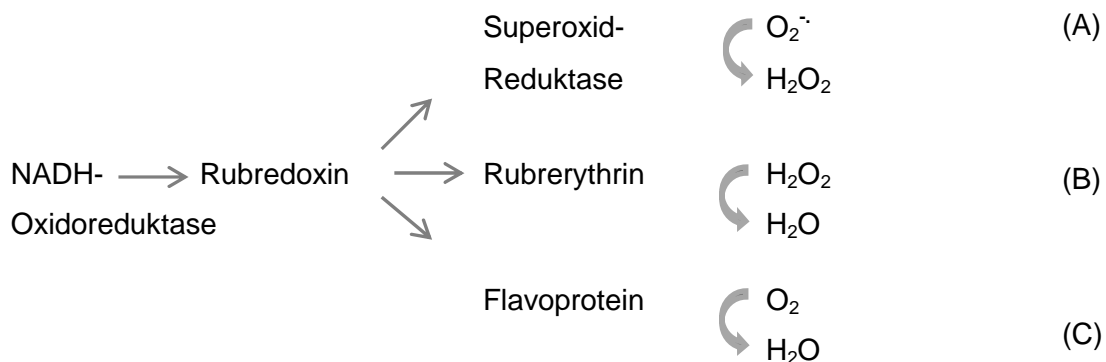


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Enzymsystems zur Eliminierung reaktiver Sauerstoffverbindungen (199). (A) Superoxid-Reduktase-Aktivität mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Produkt. (B) NADH-Peroxidase-Aktivität der Rubrerythrine. (C) NADH:Sauerstoff (O_2)-Oxidoreduktase-Aktivität der Flavoproteine. Das Produkt der beiden letzten Systeme ist Wasser.

Früher war die Auffassung verbreitet, dass anaerobe Organismen keine effektiven Enzyme zum Schutz vor oxidativem Stress besitzen. Die Entdeckung des oben beschriebenen Enzymsystems hat diese Sichtweise jedoch verändert (100). In dem anaeroben Bakterium *Clostridium acetobutylicum* wurde gezeigt, dass die Deletion des Peroxid-Repressor-Gens, *perR*, zu einer starken Produktion der Komponenten des Entgiftungssystems führt, mit der Folge, dass *C. acetobutylicum* unter aeroben Bedingungen sein Wachstum nicht komplett einstellte (88).

Methanogene *Archaea* werden ebenfalls als anaerobe Organismen betrachtet. Einige Studien haben jedoch gezeigt, dass erst bei vergleichsweise hohen Sauerstoffkonzentrationen die Methanogenese eingestellt wird (70, 192). Betrachtet man die Ökosysteme, in denen methanogene *Archaea* vorkommen, darunter Moore, Reisfelder und der Verdauungstrakt von Wiederkäuern, wird deutlich, dass dort häufig oxisch-anoxische Grenzflächen auftreten. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass methanogene *Archaea* ebenfalls einen wirkungsvollen Schutzmechanismus vor reaktiven Sauerstoffverbindungen besitzen.

Thematik dieser Arbeit

Bei Wachstum von *Ms. mazei* auf TMA stehen dem Organismus drei Methylgruppen zur Verfügung, die von einem Methyltransferase-System über ein Corrinoïd-Protein auf den zentralen Kofaktor der Methanogenese, Coenzym M, übertragen werden. Die Methyltransferasen der ersten Transferreaktion (MT1) sind Substrat-spezifisch für TMA und dessen Abbauprodukte. Im Genom von *Ms. mazei* sind verschiedene Isoenzyme der Methyltransferasen und Corrinoïd-Proteine kodiert. Die Art und Weise, wie deren Gene reguliert werden, ist nicht bekannt. Diese Arbeit beschäftigte sich zu einem Teil mit dieser Fragestellung.

Über Proteine, die in methanogenen *Archaea* reaktive Sauerstoffverbindungen eliminieren, ist nur wenig bekannt. Die interessantesten Proteine MMDx – MM0636 von *Ms. mazei* haben zum einen Ähnlichkeiten zu Enzymen, die in der Antwort der Zelle auf Sauerstoffstress beteiligt sind, und zum anderen zu Enzymen, die am Elektronentransport beteiligt sind. In dem zweiten Teil der Arbeit wurde die Funktion der Proteine MMDx – MM0636 untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien hatten mindestens den Reinheitsgrad p.a.

2.1.1 Gase

Bezeichnung	Bezugsquelle
CO ₂ (99,9 %)	Praxair Deutschland GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
H ₂ (99,9 %)	Praxair Deutschland GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
N ₂ (99,99 %)	Praxair Deutschland GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
N ₂ /CO (95 % / 5 %)	Praxair Deutschland GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
N ₂ /O ₂ (80 % / 20 %)	Praxair Deutschland GmbH (Düsseldorf, Deutschland)

2.1.2 Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Schnellendorf, Deutschland) bezogen.

2.1.3 Enzyme und Proteine

Bezeichnung	Bezugsquelle
Alkaline-Phosphatase (CIAP)	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
DNase I	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Phusion-Polymerase	Finnzymes (Hess. Oldendorf, Deutschland)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
DreamTaq-DNA-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
RevertAid Reverse Transkriptase	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Restriktionsenzyme	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) oder New England Biolabs (Frankfurt a. M., Deutschland)
Superoxid-Dismutase (Rinderleber)	Sigma-Aldrich, (Schnellendorf, Deutschland)
Thioredoxin (<i>E. coli</i>)	Sigma-Aldrich, (Schnellendorf, Deutschland)
Katalase (Rinderleber)	Sigma-Aldrich, (Schnellendorf, Deutschland)
Xanthin-Oxidase (Rindermilch)	Sigma-Aldrich, (Schnellendorf, Deutschland)
Insulin (Rinderpankreas)	Sigma-Aldrich, (Schnellendorf, Deutschland)
Cytochrom c (Pferdeherz)	Sigma-Aldrich, (Schnellendorf, Deutschland)
acetyliertes Cytochrom c	Sigma-Aldrich, (Schnellendorf, Deutschland)

(Pferdeherz)

Ferredoxin:NADP⁺-Oxidoreduktase (Spinat) Sigma-Aldrich, (Schnellendorf, Deutschland)

2.1.4 Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
InnuPrep PCRpure Kit	Analytik Jena (Jena, Deutschland)
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (Mannheim, Deutschland)
BCA Protein Assay Kit	Novagen (Darmstadt, Deutschland)
SurePrep RNA Clean-Up and Concentration Kit	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)

2.2 Organismen, Vektoren, Plasmide und Oligonukleotide

2.2.1 Organismen

Die folgenden Organismen fanden während der Arbeit Verwendung.

Stamm	Genotyp	Herkunft / Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , φ80d <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (rk ⁻ mk ⁺), λ ⁻	(85)
<i>E. coli</i> BI21	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (r _B - m _B -) λ(DE3)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
<i>E. coli</i> BI21 pLys	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (r _B - m _B -) λ(DE3) pLysS, Cm ^R	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
<i>Ms. mazei</i> Gö1	Wildtyp	DSM-Nr. 7222 (131)
<i>Ms. mazei</i> Δ 0633	Puro ^R Δ <i>mm0633</i> -Deletionsmutante von <i>Ms. mazei</i> Gö1	Diese Arbeit
<i>Wolinella succinogenes</i> nrf:: <i>mm0633</i> strep	Kan ^R <i>mm0633</i> -Expressionsstamm von <i>W. succinogenes</i>	Melanie Kern, Darmstadt, Deutschland

2.2.2 Plasmide und Vektoren

Folgende Plasmide und Vektoren fanden Verwendung.

Plasmid / Vektor	Eigenschaften	Herkunft / Referenz
pmm0631-3.1	Amp ^R , <i>mm0631</i> in pASK-IBA3	Diese Arbeit
pmm0632-3.1	Amp ^R , <i>mm0632</i> in pASK-IBA3	Diese Arbeit
pmm0633-4.2	Amp ^R , <i>mm0633</i> ohne Sequenz des Signalpeptids in pASK-IBA4	Diese Arbeit
pET22633-1	Amp ^R , <i>mm0633</i> ohne Sequenz des Signalpeptids in pET22b	Diese Arbeit
pET220633 ^{Strep-1}	Amp ^R , <i>mm0633</i> ohne Sequenz des Signalpeptids mit Strep-Tag aus pASK-IBA4 in pET22b	Diese Arbeit
pmm0634-3.1	Amp ^R , <i>mm0634</i> in pASK-IBA3	Diese Arbeit
pmm0635-3.1	Amp ^R , <i>mm0635</i> in pASK-IBA3	Diese Arbeit
pmm0636-3.1	Amp ^R , <i>mm0636</i> in pASK-IBA3	Diese Arbeit
ppDx-1.2	Amp ^R , <i>mmdx</i> in pPR-IBA1	Diese Arbeit
pTnror	Amp ^R , <i>cac2448</i> in pT, Strep-Tag am C-Terminus, Clostridium- <i>thl</i> -Promotor, <i>E. coli</i> -Clostridium Shuttlevektor	Oliver Riebe, Rostock
pTrd	Amp ^R , <i>cac2778</i> in pT, Strep-Tag am C-Terminus, Clostridium- <i>thl</i> -Promotor, <i>E. coli</i> -Clostridium Shuttlevektor	Oliver Riebe, Rostock
pJK3-Δ633	Amp ^R , <i>pac</i> -Kassette, 1 kb stromauf- und stromabwärts gelegenen DNA von <i>mm0633</i>	Prof. Dr. U. Deppenmeier
pASK-IBA3	Amp ^R , TetA Promotor/Operator, Strep-Tag am C-Terminus	IBA, Göttingen, Deutschland
pPR-IBA1	Amp ^R , T7 Promotor/lac-Operator, Strep-Tag am C-Terminus	IBA, Göttingen, Deutschland
pASK-IBA5	Amp ^R , TetA Promotor/Operator, Strep-Tag am N-Terminus	IBA, Göttingen, Deutschland
pET22B	Amp ^R , T7-Promotor/lac-Operator, <i>pelB</i> Signalpeptid, His-Tag am C-Terminus	Novagen, Darmstadt, Deutschland
pEC86	Amp ^R , Konstruiert von pEC66 und pACYC184 mit den <i>E. coli ccmABCDEFGH</i> Genen	(10)

2.2.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer stammen von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland).

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
	Klonierung von <i>mmdx</i> in pPR-IBA1
pPR1MMRdF	ATGGTAGGTCTCAAATGGGCGTATCCAAGAAAGGAGAAAAA
pPR1MMRdR	ATGGTAGGTCTCAGCGCTTTCCTCTATCAGGGTCATTTCTCCT
	Klonierung von <i>mm0631</i> in pASK-IBA3
0631f	ATGGTAGAAGACAAAATGACAGAGCATAAAGAAGTAATGGAAAG
0631r	ATGGTAGAAGACAAGCGCTTTTCAGAAGCTTCAGGGCTTCCC
	Klonierung von <i>mm0632</i> in pASK-IBA3
MM0632f	ATGGTAGGTCTCAAATGATAGGAAATGAAGAAAAATAAATAAGC
MM0632r	ATGGTAGGTCTCAGCGCTGGCTTTCAGACGCATTTTTTGC
	Klonierung von <i>mm0633</i> in pASK-IBA4, pET22b
M0633-IBA4f	ATGGTAACCTGCATTAGCGCCGCAGAGCCGAGTGGACCCGG
M0633-IBA4r	ATGGTAACCTGCATTATATCAATCCTTCTGAATAATCCTTCTGAAG
pet22633f	ATCTTGCCAAACAAAATAACTGGGGGAA
pet22633r	GCTGCTCGAGATCCTTCTGAATAATCCTT
6334inpet22	AATCTGCGGATCCGTGGAGCCACCCGCAG
	Klonierung von <i>mm0634</i> in pASK-IBA3
0634f	ATGGTAGAAGACAAAATGCAGGAAACCGAAGCCAAACCTAT
0634r	ATGGTAGAAGACAAGCGCTCTGCTTATGTGCTTCTCCGGATA
	Klonierung von <i>mm0635</i> in pASK-IBA3
MM0635f	ATGGTAGAAGACAAAATGGTAGAATCGTTAGACAAACAGGTTA
MM0635r	ATGGTAGAAGACAAGCGCTACTCTCAGCTACCTTCTTTGCTTT
	Klonierung von <i>mm0636</i> in pASK-IBA3
0636f	ATGGTAGGTCTCAAATGGAAAGCGCATACCAGAACACTGT
0636r	ATGGTAGGTCTCAGCGCTGGTCTGCATGCGGAAACTTGTG
	Primer für die reverse Transkription
0629checkfor	TGCTATGAATGTGCCCTTGAGGGCAAAGATACGG
0633r	ATGGTAACCTGCATTATATCAATCCTTCTGAATAATCCTTCTGAA
0633f	ATGGTAACCTGCATTAGCGCCATCATATTTGCCGGACCCGCA
	Screening-Primer der <i>Ms. mazei</i> Δ <i>mm0633</i> -Mutante
pucup2	GACCCGGACCGCCACATC
pucdown2	GGAGGCCTTCCATCTGTTGC
0633checkf	AGTTGCCGTCACGGTTGGCAG

0633checkr	GATAAACAGGAGTTCCTATTA Primer für die qRT-PCR
mm0632qPCRfor	GTTGGCAGTATTCCCATGT
mm0632qPCRrev	CGGACCCTGCATGTTTCTAT
MM2423qPCRfor	GGATATGCAGACCTCGAACC
MM2423qPCRrev	GGAGTCATCTCCCACCAGAA
MM1950qPCRfor	GTAATGCAGGCTCTGGAAGC
MM1950qPCRrev	TAGCATCCCCATGCTTTTTTC
MM2557qPCRfor	AATATGCGCAGCCCAAATAC
MM2557qPCRrev	CTGCTGTGACCTGAAGTGGA
mm0631qPCRfor	AAACGCTAGGGGAACTCGAT
mm0631qPCRrev	CGGAGCTCCTGAGGTGATAA
mm0636qPCRfor	GGAGCTTTACGAGCACCTTG
mm0636qPCRrev	CCTCGCTCTTTCTCTCATGC

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Zellanzucht von *Ms. mazei* in Flüssigmedium

Als Kulturgefäße dienen 16 ml Hungateröhrchen (Bellco Glass Inc., Vineland, New Jersey, USA) und Müller-Krempel-Serumflaschen (Ochs Glasgerätebau, Bovenden, Deutschland). Als Verschlüsse wurden gasdichte Stopfen aus Butylgummi bzw. Naturkautschuk verwendet. Als Gasatmosphäre diente bei der Anzucht ein N₂/CO₂-Gemisch (80 % N₂ / 20 % CO₂, v/v). Als Substrat wurde TMA, Methanol oder Acetat benutzt (90). Die Stammhaltung von *Ms. mazei* erfolgte bei 37 °C in 5 ml Komplexmedium. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen in frisches Medium überimpft.

2.3.2 Zellanzucht von *Ms. mazei* auf festem Medium

Für die Herstellung von Agarplatten wurde Standard-Medium für *Ms. mazei* mit 1,5 % Agar (w/v) verwendet. Das Medium wurde nach dem Autoklavieren mit TMA (50 mM), Cystein-HCl, Na₂S sowie Ampicillin (100 µg ml⁻¹), zur Vermeidung von Kontaminationen, und Puromycin (3 µg ml⁻¹) als Selektionsmittel auf Transformanten komplementiert. Für die Plattierung wurden Kulturen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, in Verdünnungsreihen auf Agar verteilt. Die Platten wurden dann in einen im Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products, USA) befindlichen Inkubator unter einer N₂/CO₂ Atmosphäre bei 37 °C inkubiert.

2.3.3 Stammkulturhaltung von *Ms. mazei*

Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase waren nach Zugabe von 1 - 2 ml Saccharose (50 %, w/v) für 3 - 4 Wochen bei 4 °C lagerfähig. Für eine langfristige Aufbewahrung wurden die Kulturen bei -70 °C gelagert. Hierzu wurden sterile Serumflaschen mit sterilgefiltertem H₂ begast und danach mit 2,5 ml Saccharose (50 %, w/v), 100 µl Na₂S (0,75 g / 50 ml) und 2,5 ml einer *Ms. mazei*-Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase befüllt.

2.3.4 Stammkulturhaltung von *Escherichia coli* (*E. coli*)

Für die kurzfristige Stammhaltung wurde *E. coli* auf entsprechenden LB-Agarplatten bei 4 °C gelagert. Zur längerfristigen Lagerung wurden 900 µl Zellsuspension einer Übernachtskultur mit 100 µl DMSO (steril) versetzt und bei -70 °C gelagert.

2.3.5 Luria Bertani- (LB-) Medium

LB-Medium wurde als Standard-Medium für die Anzucht von *E. coli* verwendet (141).

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ad A. dest.	1000 ml
	pH 7,5

Agarplatten wurden mit LB-Medium unter Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar hergestellt.

2.3.6 MI (maximale Induktion) -Medium

(143), modifiziert

Trypton	32 g
Hefeextrakt	20 g
ad A. dest.	950 ml
20 x M9-Lösung	50 ml
20 x M9-Lösung	
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

Ad A. dest. 1000 ml

Nach dem Autoklavieren wurden 100 ml mit steril-filtrierte Lösungen komplementiert.

0,1 M CaCl ₂	100 µl
1,0 M MgSO ₄	100 µl
1 mM FeNH ₄ Citrat	100 µl

Medienzusatz	Endkonzentration
--------------	------------------

Anhydrotetrazyklin (AHT)	0,2 µg ml ⁻¹
Ampicillin	100 µg ml ⁻¹
Chloramphenicol	35 µg ml ⁻¹
IPTG	1 - 0,1 mM

2.3.7 *Methanosarcina*-Komplexmedium

Für die Anzucht von *Ms. mazei* wurde modifiziertes *Methanosarcina*-Komplexmedium (DSMZ-Nr.120) verwendet. Das Medium ist durch Phosphat und Carbonat gepuffert. Bei Wachstum auf Acetat wurde die Menge des Carbonats verdoppelt.

K ₂ HPO ₄	348 mg
KH ₂ PO ₄	227 mg
NH ₄ Cl	500 mg
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	500 mg
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	250 mg
NaCl	2,25 g
NaHCO ₃	850 mg
NaAcetat × 3 H ₂ O	1,658 g
Hefeextrakt	2 g
Casein-Hydrolysat	2 g
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	2 mg
Resazurin	1 mg

Spurenelementlösung SL6

1 ml Vitaminlösung 10 ×

ad A. dest. 1000 ml

pH mit 6 M NaOH auf 8,5 einstellen

Nach Einstellen des pH-Werts auf 8,5 wurde das Medium begast (80 % N₂ / 20 % CO₂, v/v), um den Sauerstoffgehalt zu senken und den pH-Wert auf 7 einzustellen. Danach wurden die Gefäße luftdicht verschlossen und autoklaviert.

2.3.7.1 Vitaminlösung, 10 × konzentriert

Biotin	20 mg
Folsäure	20 mg
Pyridoxin × HCl	100 mg
Thiamin × HCl	50 mg
Riboflavin	50 mg
Nikotinsäure	50 mg
Ca-Pantothenat	50 mg
Vitamin B12	1 mg
p-Aminobenzoesäure	50 mg
α-Liponsäure	50 mg
ad A. dest.	1000 ml

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.7.2 Spurenelementlösung SL6, 10 × konzentriert (154)

ZnSO ₄	100 mg
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	30 mg
H ₃ BO ₃	300 mg
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ × 2 H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ × 6 H ₂ O	20 mg
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	30 mg
ad A. dest.	1000 ml

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

2.3.8 Bestimmung des Wachstums von *E. coli* und *Ms. mazei*

Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD₆₀₀) von Kulturen wurde eine Probe steril entnommen und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt (Photometer V550, Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland). Die Proben mit Methanogenen-Medium wurden vor der Messung mit Dithionit reduziert, um eine Verfälschung der Messwerte durch den Redoxindikator Resazurin zu vermeiden.

2.3.9 Ermittlung von Wachstumsparametern

Die Wachstumsrate μ und die Verdopplungszeit g einer Kultur wurden aus dem Auftrag des Logarithmus der gemessenen optischen Dichte bei 600 nm (x) gegen die Zeit (t) bestimmt. Im Bereich des exponentiellen Wachstums ergibt sich eine Gerade, aus deren Steigung die Wachstumsrate zu ermitteln ist. Dieser Wert dient der Berechnung der Verdopplungszeit. Angewandt wurden die nachstehenden Formeln (172).

Wachstumsrate: $\mu = m / \log e$

Steigung: $m = \log x_t - \log x_0 / t - t_0$

Verdopplungszeit: $g = \ln 2 / \mu$

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von chromosomaler DNA aus *Ms. mazei*, modifiziert

Die Methode der DNA-Isolierung aus *Ms. mazei* beruhte auf der direkten Lyse der Zellen in Reinstwasser. 5 ml einer Kultur in der exponentiellen Phase wurde abzentrifugiert und das Pellet in sterilem Reinstwasser lysiert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (25.000 × g; 4 °C; 10 min) und der Überstand mit der DNA bei 4 °C gelagert.

2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmiden wurde das GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers eingesetzt.

2.4.3 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Ansätzen wurde mit dem Wizard SV Gel und PCR Clean-up System Kit der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) entsprechend der Anleitung durchgeführt. PCR-Ansätze wurden vor der Behandlung mit Restriktionsendonukleasen und Restriktionsansätze vor der Ligation von DNA gereinigt.

2.4.4 Isolierung von RNA

Die RNA von *Ms. mazei* wurde aus 50 ml Kulturen gereinigt. Die Zellen wurden pelletiert (10.000 × g, 4 °C) und in 5 ml TRI-Reagent aufgenommen (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Deutschland) und nach Angabe des Herstellers gereinigt.

Die RNA wurde einem DNase I-Verdau nach Angabe des Herstellers (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) unterzogen und anschließend mit dem SurePrep RNA Clean-up und Concentration Kit nach Angaben des Herstellers (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) gereinigt. Mit PCR wurde die RNA auf DNA-Kontaminationen überprüft.

2.4.5 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die Konzentration von RNA und doppelsträngiger DNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Photometer V550, Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) (169). Eine Absorption von 1,00 ist äquivalent zu einer Konzentration doppelsträngiger DNA

von 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Bei Vermessung der RNA beträgt der Wert 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Verunreinigungen der DNA durch Proteine konnten durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm ermittelt werden.

2.4.6 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine *in vitro*-Methode zur Vervielfältigung eines definierten Stücks DNA (146). Kurze Oligonukleotide dienen als Startmoleküle für die Polymerase und gleichzeitig als Marker für den zu amplifizierenden DNA-Bereich. Die Polymerase aus *Thermococcus aquaticus* (Taq-Polymerase) wurde für das Screening von Klonen, der Überprüfung der Mutanten und der PCR auf cDNA verwendet. Für alle PCR, deren Amplifikate für Klonierungen verwendet werden sollten, wurde die *Phusion*-Polymerase verwendet. Der Reaktionsansatz und das PCR-Programm wurden nach Angabe der Hersteller der Polymerasen zusammengesetzt bzw. programmiert. Die Nukleotide stammten von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland). Die Dauer der Synthesephase richtete sich nach der Länge des erwünschten Amplifikats und der verwendeten Polymerase.

2.4.7 Synthese von cDNA

Die reverse Transkriptase RevertAid premium (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Eingesetzt wurden 2 bis 5 μg RNA, 20 pmol Primer, 0,5 mM dNTP, Puffer, RNase-Inhibitor und Enzym sowie DEPC-behandeltes Wasser. Die PCR mit cDNA wurde mit der Dream-Taq-Polymerase nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland).

2.4.8 Real-Time quantitative reverse Transkriptions-PCR

Ausgewählte Transkripte aus dem gesamt-mRNA-Pool einer Kultur wurde durch Real-Time quantitative reverse Transkriptions-PCR (qRT-PCR) quantifiziert. Die RNA wurde stets von 50 ml Kulturen wie oben angegeben isoliert (Kapitel 2.4.4). Die qRT-PCR wurde auf einem iCycler (Bio-Rad, München, Deutschland) mit dem Quantitect SYBR Green Reverse Transcription-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Die Primer für die qRT-PCR wurden mit dem PC-Programm Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) generiert und ergaben zwischen 100 und 250 Basenpaare lange Amplifikate. Die Ct-Werte für jede Reaktion wurden mit der iCycler Software berechnet. Kontrollreaktionen ohne reverse Transkriptase wurden durchgeführt, um zu verifizieren, dass die Ansätze keine genomische DNA enthalten.

Die Bestimmung der relativen cDNA-Menge der Präparation wurde durch eine Normalisierung der Signale über einen Abgleich mit den Expressionswerten eines Referenzgens erreicht.

Das Gen der Glyceraldehyde-Dehydrogenase (*gap*) wurde als Standard verwendet, da es ein Zentral-Gen des Stoffwechsels ist. In verschiedenen Studien wurde keine differenzierte Transkript-Menge von *gap* gefunden, weder in Expressionsstudien von *Ms. mazei* bei Wachstum auf verschiedenen Substraten, noch bei geringen oder hohen Satzkonzentrationen oder bei geringem oder hohem Stickstoffgehalt (93, 155, 195). Zusätzlich wurde das Gen *mm2536*, das das Protein L21e der 50S ribosomalen Untereinheit codiert, als Standard verwendet. Die Ct-Werte (Threshold-Cycle-Werte oder Schwellenwert-Zyklen) mit diesem Standard waren mit den Ct-Werten des zweiten Standards, *gap*, vergleichbar. Die Spezifität jeder Reaktion wurde durch Analyse der Schmelzkurven bestimmt. Die ΔCt -Werte wurden mit der relativen Transkript-Menge von *gap* als Standard berechnet ($Ct_{Gen} - Ct_{gap}$). Die Transkriptions-Raten wurden aus den ΔCt -Werten mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$ berechnet.

2.4.8.1 qRT-PCR des Operons *mmdx – mm0636*

Zum einen wurde die Expression des Operons *mmdx – mm0636* mittels qRT-PCR untersucht. Hierzu wurde die Transkriptionsrate einer Wildtyp *Ms. mazei*-Kultur, die mit Sauerstoff geschockt wurde, mit einer Wildtyp-*Ms. mazei* Kultur ohne Sauerstoffschock verglichen. Eine Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase wurde für 5 min bei 37 °C mit künstlicher Luft (20 % O₂, 80 % N₂) begast und danach durch aerobe Zentrifugation bei 4 °C pelletiert. Der Wildtyp ohne Sauerstoffschock wurde anaerob bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellpellets wurden sofort mit TRI-Reagent versetzt (Kapitel 2.4.4) und die RNA aufgereinigt.

2.4.8.2 qRT-PCR der Methyltransferasegene

Das zweite Experiment mit qRT-PCR diente zur Analyse der Transkription der Methyltransferasegene. Hierzu wurden TMA-gewachsenen Kulturen bei optischen Dichten von 0,5 bis 2,2 geerntet und die RNA der jeweiligen Kulturen zur Transkriptquantifizierung in qRT-PCR -Experimenten eingesetzt. Um das Problem der Kreuz-Hybridisierung zwischen hoch homologen Genen der Methyltransferasen zu übergehen, wurden Gen-spezifische Primer für qRT-PCR Experimente entworfen.

Zuerst wurden homologe Gene mit dem Programm ClustalW miteinander verglichen und Regionen, die maximale Unterschiede zeigten, für Primergenerierung verwendet.

Das Annealing der einzelnen Primer und der möglichen Kombinationen der einzelnen Primer wurde in qRT-PCR mit chromosomaler DNA oder Plasmiden, die die

korrespondierenden Gene tragen, überprüft. Die Kombinationen aus spezifischen forward und reversen Primern erzeugten mit der qRT-PCR Signale, die zu mindestens siebenfach höheren Ct-Werten führten, als die Kombination von Primern für unterschiedliche, homologe Gene.

Die in diesem Versuch verwendeten Primer sind demnach als Gen-spezifisch unter den qRT-PCR Bedingungen anzusehen und verursachen keine, das Experiment beeinträchtigenden, Kreuzreaktionen mit homologen Genen. Um der Frage nachzugehen, ob es Unterschiede in der Effizienz der Reaktionen von Ziel- und Referenzgenen gab, wurden die Experimente mit den Methyltransferasegenen mit einem zweiten Primerpaar für die *mtt*-, *mtb*- und *mtm*-Gene wiederholt. Die hier verwendeten Primer banden an eine andere Position in dem Gen, als die zuvor verwendeten. Die Ct-Werte in dem Kontrollexperiment waren mit dem Ct-Werten aus dem ersten Experiment fast identisch, was auf eine vergleichbare Effektivität der reversen Transkriptasereaktion und DNA-Amplifikation über PCR schließen lässt.

2.4.9 Enzymatische Modifikation von DNA

2.4.9.1 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde stets nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland und New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland). Die Restriktionsansätze wurden durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.4.9.2 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Vektoren können vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase (FastAP) behandelt werden, um die Wahrscheinlichkeit der Rezirkularisierung zu vermeiden. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse der Phosphatgruppen am 5'-Ende der DNA. Den Restriktionsansätzen wurden nach dem Verdau 2,5 U alkalische Phosphatase zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert.

2.4.9.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Als Ligation bezeichnet man die Verknüpfung des 3'-Hydroxy- und des 5'-Phosphat-Endes einer Ribonukleinsäure durch das Enzym T4-DNA-Ligase. Vektor- und Insert-DNA wurden im Verhältnis 1:3 oder 1:1 in einem Gesamtvolumen von 8 µl in Reinstwasser eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte entweder für 2 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C.

2.4.10 Visualisierung von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA Fragmenten (169). Die Agarose-Konzentration im Gel betrug 1 % in TAE-Puffer (w/v), die Proben wurden vor dem Auftragen mit Beschwererlösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) versehen. Zur Größenbestimmung von DNA wurde der 1 kb DNA-Marker GeneRuler (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Der Elektrophorese-Puffer bestand aus 1 × TAE-Puffer. Die angelegte Spannung war konstant zwischen 80 und 110 Volt.

TAE-Puffer

TRIS	40 mM
EDTA	10 mM
Essigsäure	20 mM

pH mit HCl auf 8,5 einstellen

2.4.11 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Präparation kompetenter Zellen wurden 250 ml LB-Medium bei 37°C und 180 U min⁻¹ im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 gezogen und abzentrifugiert (10 min, 7.000 × g, 4°C). Die Zellen wurden in 80 ml Transformationspuffer vorsichtig resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert (10 min, 7.000 × g, 4°C). Das Pellet wurde vorsichtig in 15 - 20 ml TB aufgenommen und DMSO in einer Endkonzentration von 7 % hinzugegeben. Es folgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis und das Abfüllen von Aliquots, die in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert wurden.

Transformationspuffer

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

SOB-Medium

Trypton	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,19 g
A. dest.	990 ml
MgCl ₂ 1 M	10 ml

2.4.12 Transformation von *E. coli* durch Hitze-Schock

Ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen wurde mit dem Ligationsansatz vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 sek bei 42°C und 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden 500 µl steriles LB-Medium hinzugegeben und die Kultur für 30 – 60 min bei 37°C und 180 U min⁻¹ inkubiert. Für die Selektion transformierter Klone mit Hilfe der vektorbasierenden Resistenz wurden 50 - 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert.

2.4.13 Liposomen-vermittelte Transformation von *Ms. mazei*

Alle Schritte wurden in der einem Anaerobenzelt nach der Methode von Ehlers *et al.* (2005) durchgeführt (62). Kulturröhrchen mit 5 ml Methanogenium-Medium wurden mit *Ms. mazei* angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,8 angezogen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10.000 × g, 20 min) und das Zellpellet in Bicarbonat/Sucrose-Lösung resuspendiert. 2 µg der zu transformierenden DNA wurden in 48 µl Bicarbonat/Sucrose-Lösung gelöst und anschließend mit dem zuvor in 70 µl Bicarbonat/Sucrose-Lösung gelösten 30 µl DOTAP-Reagenz vermischt. Zur Ausbildung des DNA-Liposomenkomplexes wurde die Mischung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die resuspendierten *Ms. mazei*-Zellen mit der DNA-Liposomenmischung vereint. Nach einer 5 - 6 stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 5 ml Methanogenium-Medium, versetzt mit 0,5 M Sucrose, der Zellmischung zugefügt und diese für 12 - 16 h inkubiert. Anschließend wurde frisches Methanogenium-Medium (5 ml) mit 0,5 M Sucrose beimpft und, zur Selektion von Puromycin-resistenten Klonen, mit 3 µg ml⁻¹ Puromycin versehen. Trat sichtbares Wachstum auf, wurde die Kultur ausplattiert.

Bicarbonat/Sucrose-Lösung

Sucrose	0,85 M
Na ₂ CO ₃	4,2 g L ⁻¹
DTE	5 mM
Resazurin	1 mg ml ⁻¹

2.4.14 Generierung einer Knockout-Mutante von *Ms. mazei*

Zur Generierung von Deletionsmutanten wurde der Suizidvektor pJK3 verwendet, der die im Genom stromaufwärts (upstream) und stromabwärts (downstream) liegenden DNA-Sequenzen des zu deletierenden Gens enthält. Beide Sequenzen werden in gleicher Orientierung mit einem Resistenzmarker verbunden, der die Resistenz gegen Puromycin kodiert. Der Deletionsvektor wurde linearisiert und mittels Liposomen-

vermittelter Transformation in *Ms. mazei*-Zellen eingebracht. Hier wird durch den Vorgang der doppelt-homologen Rekombination das zu deletierende Gen aus dem Genom entfernt und anstelle des intakten Gens die Puromycin-Resistenzkassette (*pac*) eingefügt. Die Puromycin-Resistenz wird durch eine Puromycin-Acetyltransferase von *Streptomyces alboniger* vermittelt. Eine starke Expression des *pac*-Gens wird durch den Promoter PmcrB der Methyl-CoM-Reduktase aus *Ms. mazei* garantiert. Nach erfolgter Transformation wurde ein Klon ausgewählt und mittels PCR überprüft. Die Mutante wurde durch Sequenzierung der Amplifikate bestätigt.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Produktion von Proteinen

2.5.1.1 Heterologe Proteinproduktion

In dieser Arbeit wurden folgende *E. coli*-Stämme verwendet: *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21 und *E. coli* BL21(pLys). Folgende Vektor-Systeme kamen zur heterologen Expression in *E. coli* zum Einsatz: das pASK-IBA und pPR-IBA System (IBA, Göttingen, Deutschland) sowie das pET-System (Novagen, Darmstadt, Deutschland). Die pASK-IBA-Vektoren besitzen einen Tetrazyklin-Operator und einen konstitutiv vorhandenen Repressor, der durch Anhydrotetrazyklin inaktivierbar ist. Der Tet-Promotor ermöglicht die Expression unabhängig von der T7-Polymerase. Das pET und das pPR-IBA System besitzen den T7-Promotor und Lac-Operator. Der T7-Promotor ist nur in *E. coli* BL21 funktional. Der Lac-Repressor ist durch IPTG inaktivierbar, wobei es ohne Induktion durch IPTG zu einer Basalexpression kommt. Das Medium wurde mit Antibiotikum und Mineralsalzen komplementiert und mit der Vorkultur 1% (v/v) angeimpft. Die Proteinproduktion wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6 – 1,2 durch die Zugabe von Anhydrotetrazyklin (0,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$) oder IPTG (Konzentration je nach Versuch variabel) induziert. Es folgte eine Inkubation von 4 h oder über Nacht bei 28 °C. Zur Zellernte wurden die Zellen abgekühlt und abzentrifugiert (7.000 \times g, 15 min, 4°C). Die Proteine, die in dieser Arbeit produziert wurden, binden mehrere unterschiedliche Kofaktoren. Um während der Produktion in *E. coli* einen Mangel an Eisen, Schwefel oder Flavinen zu vermeiden, wurde den Kulturen je nach Kofaktor des produzierten Proteins Eisen, Schwefel oder Flavin zugegeben.

MMDx	40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ FeNH ₄ -Citrat
MM0631	40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ FeNH ₄ -Citrat, 1 mM Cystein
MM0632	1 mM Cystein, 0,1 mg ml ⁻¹ FeNH ₄ -Citrat, 0,1 mg ml ⁻¹ FeSO ₄ \times 7 H ₂ O

MM0633	100 μM Aminolävulinsäure
MM0634	0,1 mg ml^{-1} $\text{FeNH}_4\text{-Citrat}$, 0,1 mg ml^{-1} $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 mM Cystein, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Riboflavin
MM0635	50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Riboflavin
MM0636	40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ $\text{FeNH}_4\text{-Citrat}$

2.5.1.2 Anaerobe heterologe Proteinproduktion

Proteine mit Eisen-Schwefel-Clustern sind häufig sauerstoffempfindlich. Aus diesem Grund wurden Proteine mit diesem Kofaktor unter anaeroben Bedingungen produziert und gereinigt. Die Kulturen wurden wie oben beschrieben angeimpft und bis zu einer OD_{600} von etwa 1,2 bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Proteinproduktion induziert und Zusätze zugegeben. Die Kultur wurde durch N_2 -Begasung anaerobisiert und mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen. Nach der Produktion erfolgte sowohl die Zellernte, als auch der Zellaufschluss unter anaeroben Bedingungen.

2.5.1.3 Produktion von MM0633 in *Wolinella succinogenes*

Der Organismus *W. succinogenes* eignet sich besonders für die Produktion von c-Typ-Cytochromen (108). Der in dieser Arbeit verwendete Expressions-Stamm von *W. succinogenes* trägt im Genom anstelle des *nrfA*-Gens das Gen *mm0633* aus *Ms. mazei* mit der Sequenz des Strep-Tags und der Sequenz des Signalpeptids von *nrfA* (M. Kern, Technischen Universität Darmstadt, Deutschland). Das Gen wurde in einer für *W. succinogenes* optimalen Codon-Folge synthetisiert (Geneart, Regensburg, Deutschland) und in den Vektor pnrF kloniert. Der resultierende Vektor wurde durch Transformation in *W. succinogenes* eingebracht, wo das Gen über den Vorgang der doppelt-homologen Rekombination in das Genom inseriert wurde.

W. succinogenes wurde in dieser Arbeit auf Nitrat-Medium wie in der Literatur beschrieben angezogen (107), 5 - 10 Liter wurden geerntet und mit der French-Press aufgeschlossen. Das Protein MM0633 war in *W. succinogenes* in der Membranfraktion zu finden. Daher musste die Membranfraktion mit Detergenzien behandelt werden, um das Protein in Lösung zu überführen. Hier kamen die Detergenzien Triton X100 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Dodecylmaltosid (Gylcon, Luckenwalde, Deutschland) zum Einsatz.

2.5.1.4 Produktion von Proteinen aus *Clostridium acetobutylicum*

Die Vektoren pTrd und pTnrR wurden von Dr. O. Riebe (Universität Rostock, Deutschland) zu Verfügung gestellt. Die Protein-Produktion und -Reinigung geschah wie in der Literatur beschrieben (163).

2.5.2 Zellaufschluss

2.5.2.1 Zellaufschluss durch Ultraschall

E. coli-Zellen wurden aerob durch Ultraschall (Ultraschallgerät UP 200s, Hielscher GmbH, Teltow, Deutschland) aufgeschlossen (0,5 min ml⁻¹ resuspendierte Zellen). Das Zelllysate wurde für 15 min bei 12.000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde vom Pellet abgetrennt, das unlösliche Bestandteile enthält.

2.5.2.2 Zellaufschluss durch French-Press

Die Zellsuspension wurde in die vorgekühlte French-Press-Druckzelle gefüllt und die Zellen durch einen Außendruck von ca. 6900 kPa (ca. 1000 Psi) aufgeschlossen. Das entspricht einem Innendruck von ca. 110300 kPa (ca. 16000 Psi). Zellen von *Ms. mazei* wurden im Anaerobenzelt in die French-Press-Druckzelle gefüllt, und nach dem Aufschluss in anaeroben Gefäßen aufgefangen. *W. succinogenes*-Zellen wurden aerob aufgeschlossen. Die lysierten Zellen wurden in anaeroben Hungateröhrchen aufgenommen. Zellsuspensionen von *W. succinogenes* und *E. coli* konnten in einem Durchgang aufgeschlossen werden.

2.5.2.3 Zellaufschluss durch Lysepuffer

Der Zellaufschluss durch Lysepuffer wurde durchgeführt, um Proteine anaerob aufzureinigen. Die anaerob geernteten Zellen wurden in anaerobisiertem Puffer W (Kapitel 2.5.3) mit 5 mM DTE resuspendiert und mit dem Lysereagens B-Per (Thermo-Scientific, Bremen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers versetzt. Der Suspension wurde eine kleine Spatelspitze Lysozym, 0,5 – 1 U DNase pro ml Zellsuspension und Protease Inhibitor Cocktailset (nach Angabe des Herstellers) zugegeben. Die Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen überführt, die luftdicht verschließbar waren, und außerhalb des Anaerobenzelts für 30 min gekühlt unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach konnten die Zelltrümmer durch Zentrifugation (15 min bei 12.000 × g) von den löslichen Proteinen abgetrennt werden.

2.5.3 Reinigung von Proteinen

Proteine, die mit einem Strep-Tag versehen waren, wurden nach Anweisung des Herstellers (IBA, Göttingen, Deutschland) aufgereinigt. Zum Lösen von Zellpellets und als Waschpuffer wurde Puffer W verwendet, als Elutionspuffer diente Puffer W mit 2,5 mM Desthiobiotin (Puffer E).

Puffer W

100 mM Tris-Cl

150 mM NaCl

pH 8 mit HCl einstellen

Das Protein MM0633 wurde auch mit His-Tag aufgereinigt. Die Reinigung geschah nach Angabe des Herstellers der Nickel-Cellulose (Roth, Karlsruhe, Deutschland). Als Puffer diente K-Phos-Puffer (20 mM, pH 7,4) mit 0,5 M NaCl. Zur Elution diente Imidazol in einem Stufengradient von 0 – 500 mM. Gereinigte Proteine wurden durch Entsalzen mittels PD-10 Säulen (GE-Healthcare, Freiburg, Deutschland) von Imidazol befreit (Kapitel 2.5.6).

2.5.3.1 Proteinreinigung unter anaeroben Bedingungen

Sauerstoffempfindliche Proteine wurden im Anaerobenzelt aufgereinigt. Die Reinigung geschah wie oben beschrieben, mit anaerobem Puffer. N₂-begaster Puffer W (Kapitel 2.5.3) und Puffer E (Kapitel 2.5.3) wurden mit 5 mM DTE versetzt. Für anaeroben Puffer ohne DTE wurde Puffer W mit N₂ begast und über Nacht geöffnet im Anaerobenzelt inkubiert. Enzyme, die in Puffer E mit DTE aufgenommen wurden, wurden in Glasbehältnissen aliquotiert, mit Gummistopfen verschlossen und in kleinen Serumflaschen verschlossen. Die Serumflaschen enthielten Katalysator und H₂, um eventuell eindringenden Sauerstoff zu entfernen.

2.5.3.2 Reinigung von Ferredoxin aus *Clostridium pasteurianum*

Ferredoxin kann aus *Clostridium pasteurianum* durch eine aerobe Reinigung isoliert werden (142). Eine Kultur von *C. pasteurianum* DSM 525 in der späten exponentiellen Phase und mit einem Volumen von 8 L wurde geerntet und in 200 ml Wasser (4 °C) aufgenommen. 200 ml kaltes Aceton wurde zugegeben und der Ansatz für 15 min in einem Eisbad unter Rühren inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile der Lösung wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 7000 x g und 4 °C pelletiert und der Überstand auf eine Anionenaustauschsäule aufgetragen (DEAE-Cellulose, 2,5 x 8 cm, äquilibriert mit 50 % (v/v) Aceton). Das gefärbte Ferredoxin bildete einen braunen Ring am oberen Ende der Säule. Gebundenes Ferredoxin wurde durch 200 mM Tris-HCl Puffer (pH 8,0) gewaschen, bis keine Flavine mehr im Durchfluss erschienen. Mit 500 mM Tris-HCl Puffer (pH 8,0) wurde das Ferredoxin eluiert, mit Vivaspin 500 Zentrifugationsröhrchen (Sartorius, Göttingen, Deutschland) eingeeengt, aliquotiert und bei - 70 °C gelagert.

2.5.4 Präparation der Membranfraktion von *Ms. mazei*

Alle Reinigungsschritte der Membranpräparation wurden in einem Anaerobenzelt durchgeführt. Zwei bis vier Liter einer exponentiell wachsenden *Ms. mazei*-Kultur

wurden in der exponentielle Phase durch Zentrifugation in Gas-dichten Zentrifugenbechern (3000 x g, 30 min) geerntet.

Anschließend wurde das Zellpellet in K-Phos-Puffer (40 mM, pH 7,0) mit 5 mM DTE und $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ Resazurin resuspendiert und für 30 min bei 4 °C mit einer geringen Menge DNase I inkubiert. Nach einer Ultrazentrifugation (90 min, 150,000 x g) wurde das Membranpellet mit K-Phos-Puffer (20 mM, pH 7.0), 20 mM MgSO_4 , 500 mM Saccharose, 5 mM Dithioerythritol und $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ Resazurin resuspendiert. Die Ultrazentrifugation wurde wiederholt und das Pellet in den oben beschriebenen Puffer aufgenommen (300 μl / L Kultur). Die Membranfraktion wurde durch die Aktivität der CO-Dehydrogenase, die nur im Cytoplasma vorkommt, auf cytoplasmatische Rückstände untersucht.

2.5.5 Detektion von Proteinen

2.5.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-Reagenz (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Deutschland) bestimmt. Das Testprinzip beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 in saurer Lösung durch Bindung an positiv geladene Aminosäuren (28). Die Probe wurde mit 0,98 ml Bradford-Reagenz versetzt und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 595 nm. Proben wurden stets mit einer Doppelbestimmung untersucht und mit BSA-Kalibrierungskurven zwischen 0 – 1 mg ml^{-1} verglichen

2.5.5.2 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure

Der Proteinbestimmungs-Assay mit 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (BCA-Test) zeichnet sich durch seine Unempfindlichkeit gegenüber Detergenzien aus, die Lösung reagiert jedoch mit DTE und DTT (182). Der BCA-Test kam insbesondere bei kleinen Proteinen zum Einsatz, die mit Bradford nur schlecht detektiert werden können. Der Test wurde in Mikrotiterplatten nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Eichkurve wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) im Bereich von 0 – 1 mg ml^{-1} aufgenommen. Für alle Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

2.5.5.3 Proteinbestimmung über die Absorption bei 280 nm

Die Methode basiert auf der Absorption von UV-Licht durch aromatische Proteinseitenketten, hauptsächlich der Tryptophan- und Tyrosin-Reste und zu geringen Anteilen der Disulfidbrücken.

Der molare Absorptionskoeffizient der Proteine wurde über die Extinktionskoeffizienten für Tryptophan, Tyrosin und der Disulfide berechnet:

$$\epsilon_{280} = (5500 \times n_{\text{Trp}}) + (1490 \times n_{\text{Tyr}}) + (125 \times n_{\text{S-S}})$$

nTrp: Anzahl der Tryptophanreste, nTyr: Anzahl der Tyrosinreste nS-S: Anzahl der Disulfidbindungen.

Die Proteinkonzentration wurde nach Messung der Absorption bei 280 nm über das Lambert-Beer'sche Gesetz bestimmt.

2.5.5.4 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) trennt Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf (118). Die Acrylamid-Endkonzentration des Trenngels variierte ja nach Größe des untersuchten Proteins zwischen 12,5 % (w/v) und 18 % (w/v). Das Sammelgel enthielt immer 5% (w/v) Acrylamid. Als Elektrophoresekammern dienten vertikale Mini-Gel-Kammern (BioRad, München, Deutschland). Vor dem Auftrag der Proben wurden diese 1:1 mit 2 x Probenpuffer (120 mM Tris/HCl, pH 6,8; 20 % (v/v) Glycerin; 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 4 % (v/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach dem Auftragen der Proben (10 mA pro Gel) erfolgte die Auftrennung im Trenngel (15-20 mA pro Gel). Das Molekulargewicht der denaturierten Proteine wurde mit Hilfe des parallel aufgetragenen Größenstandards bestimmt. Bei kleinen Proteinen kam eine Proteinleiter mit kleinen Markerproteinen zum Einsatz (Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland).

Acrylamid-Lösung	Rotiphorese Gel 40 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	
Trenn-Puffer	Tris	22,77 g
	A. dest.	ad 100 ml
	pH 8,45 mit HCl einstellen	
Tris-Puffer	Tris	3 M
	SDS	0,4 %
	pH 8,45 mit HCl einstellen	
Sammel-Puffer	Tris	7,57 g
	A. dest.	ad 100 ml
	pH 6,8 mit HCl einstellen	
SDS-Lösung	SDS	0,5 %
Ammoniumpersulfat-Lösung (APS)	APS	10 %
Elektroden-Puffer	Tris	3,0 g
	Glycin	14,4 g

SDS	1,0 g
A. dest.	ad 1000 ml
pH 8,3	

Das Trenn-Gel wurde wie folgt aus den oben beschriebenen Lösungen hergestellt: Rotiphorese Gel 40: 1,5 bis 2,7 ml (10 % bis 18 % -Endkonzentration); SDS-Lösung: 1,2 ml; Trenn-Puffer: 1,2 ml; ad A. dest. 6 ml, mit 5 µl TEMED und 30 µl APS pro Gel wurde die Polymerisation gestartet. Das Sammel-Gel wurde wie folgt aus den oben beschriebenen Lösungen hergestellt: Rotiphorese Gel 40: 0,25 ml (5%-Endkonzentration); SDS-Lösung: 0,4 ml; Sammel-Puffer: 0,4 ml; ad A. dest. 2 ml. Mit 5 µl TEMED und 30 µl APS pro Gel wurde die Polymerisation gestartet. Das Trenn-Gel für die Analyse kleiner Proteine enthielt Ethylenglycol (30 %) und 18 %Acrylamid.

2.5.5.5 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine sehr sensitive Methode, um Proteine in Acrylamid-Gelen anzufärben. Es wurden 0,5 – 2 µg Protein aufgetragen, aufgetrennt und wie im Folgenden beschrieben angefärbt (21).

Fixierer	Methanol	500 ml
	Eisessig	120 ml
	Formaldehyd 37% (v/v)	0,5 ml
	A. dest.	ad 1000 ml
Waschlösung	Ethanol	250 ml
	A. dest.	ad 500 ml
Natriumthiosulfatlösung	Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O	0,2 g
	A. dest.	ad 1000 ml
Imprägnier-Lösung	AgNO ₃	2 g
	Formaldehyde 37% (v/v)	0,75 ml
	A. dest.	ad 1000 ml
Entwickler-Lösung	Na ₂ CO ₃	60 g
	Formaldehyd 37% (v/v)	0,5 ml
	Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O	4 mg
	A. dest.	ad 200 ml
Stopplösung	EDTA	18,6 g
	A. dest.	ad 1000 ml

Als erster Schritt wurden Proteine durch Inkubation des Gels mit Fixierlösung im Gel fixiert. Anschließend wurde das Gel 3 × 1 min in Wasser gewaschen und für 1 min mit Natriumthiosulfatlösung überschichtet. Nach dreimaligem Waschen für 20 sek in H₂O

wurde das Gel für 20 min in Imprägnierlösung inkubiert. Darauf wurde es erneut zweimal für 20 sek in H₂O gewaschen und in Entwicklerlösung überführt, worin die Silberionen in basischer Lösung durch Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert und als Banden sichtbar werden. Bevor das Gel in die Stopp-Lösung gegeben wurde, wurde es kurz gewaschen.

2.5.5.6 Häm-Färbung von Cytochromen

Cytochrome können mit einer Häm-Peroxidase-Aktivitätsfärbung nachgewiesen werden, die auch nach Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen erhalten bleibt. Das Protein wurde vor dem Auftragen auf die SDS-PAGE nicht gekocht und mit Probenpuffer ohne β-Mercaptoethanol versetzt. Das SDS-Gel wurde in drei Teilen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (6,3 mM in MeOH) und sieben Teilen Na-Acetat-Puffer, (0,25 M, pH 5) für 1 h im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,1 % v/v, 30 % H₂O₂ gestartet.

2.5.5.7 Western-Blot

Towbin-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, ad 1000 ml A. dest., pH 8,3
PBS-Puffer	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml A. dest., pH 7,3
PBS-Tween-Puffer	PBS-Puffer mit 0,1 % v/v Tween 20
Nachweisreagenz	4-Chloro-1-Naphthol 3 % w/v in Methanol
H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ (30 %)

Proteine, die über eine SDS-PAGE aufgetrennt werden, können nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran über einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Der Strep-Tag wurde durch einen monoklonalen Antikörper (IBA, Göttingen) detektiert, der mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Die Nachweisreaktion machte sich die Umsetzung von Wasserstoffperoxid und 4-Chloro-1-Naphthol als Substrate der Peroxidase zu Nutze.

Die Blotmembran aus Nitrocellulose (4,5 µm, [BioRad, München, Deutschland]) wurde zur Aktivierung der Proteinbindestellen 15 min in Towbin-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde der Blot in folgender Reihenfolge auf der Anode des Semi-Dry Blotgeräts (Biozym, Oldendorf, Deutschland) aufgebaut: drei Towbin-Puffer-getränkte Whatman-3MM-Papiere, Nitrocellulosemembran, Polyacrylamidgel, drei Towbin-Puffer-getränkte Whatman-3MM-Papiere. Nach dem Transfer der Proteine (15 V, 15 min), wurde die Membran in PBS-Tween Puffer mit 5 % Milchpulver oder 2 % BSA für eine Stunde inkubiert. Anschließend folgten 3 Waschschrte (je 5 min) mit PBS-Tween

Puffer und die Inkubation mit dem Antikörper, der in 20 ml PBS-Puffer nach Angaben des Herstellers verdünnt wurde. Überschüssiger Antikörper wurde durch 2 Waschschriffe (je 5 min) mit PBS-Tween Puffer und einen Waschschriff mit PBS-Puffer entfernt. Für die Färbereaktion wurde das Gel im Dunkeln in 20 ml PBS-Puffer mit 200 µl 4-Chloro-1-Naphthol und 20 µl H₂O₂ versetzt.

2.5.6 Einengen und Entsalzen von Proteinen

Proteine wurden in kleinem Maßstab durch Zentrifugieren mit Vivaspin 500 Zentrifugationsröhrchen (Sartorius, Göttingen, Deutschland) nach Angabe des Herstellers eingengt. Mit dieser Methode konnte unter anaeroben Bedingungen der Puffer, in dem ein Protein gelöst war, ausgetauscht werden. Durch wiederholtes Einengen und Auffüllen mit frischem Puffer wurde die Präparation gewaschen. In der Regel wurde eine 250 µl Proteinprobe auf 50 µl eingengt und drei Mal auf 200 µl aufgefüllt. Verunreinigungen wurden so 125-fach verdünnt.

Zur Entsalzung von Proteinen wurden PD-10 Säulen (GE-Healthcare, Freiburg, Deutschland) eingesetzt. Das sind mit Sephadex gefüllte, vorgepackte Säulen, die das Protein über den Molekularsiebeffekt von Salzen im Puffer trennen. Die PD-10 Säulen wurden wie vom Hersteller angegeben verwendet.

2.5.7 Rekonstitution von Proteinen

2.5.7.1 Rekonstitution von MM0632

MM0632 wurde nach dem Zellaufschluss und der Abtrennung der Zelltrümmer im löslichen Zellüberstand durch die Zugabe von 1mM FeCl₃ und 1mM Na₂S sowie 10 mM Dithiothreitol für 30 min auf Eis rekonstituiert (modifiziert nach Hamann *et al.*, 2007) (84). Unlösliche Komponenten wurden anschließend durch Zentrifugation (12.000 × g, 20 min) unter anaeroben Bedingungen entfernt. Die affinitätschromatographische Proteinreinigung geschah anaerob wie in Kapitel 2.5.3.1 beschrieben. Das gereinigte Protein wurde durch in Vivaspin 500 Zentrifugationsröhrchen (Sartorius, Göttingen, Deutschland) oder PD-10 Säulen (GE-Healthcare, Freiburg, Deutschland) mit anaeroben Puffer W mit 5 mM DTE (Kapitel 2.5.3) gewaschen (Kapitel 2.5.3.6) und die finale Proteinkonzentration auf 1,5 bis 2 mg ml⁻¹ eingestellt.

2.5.7.2 Rekonstitution von MM0636

MM0636 wurde nach der affinitätschromatographischen Reinigung rekonstituiert. Das Protein in Puffer E (Kapitel 2.5.3) wurde mit der 50-fachen molaren Menge DTT versetzt, danach die 8-fache molare Menge FeCl₃ zugegeben und der Ansatz für 1 h

auf Eis in einem Anaerobenzelt inkubiert modifiziert nach Cicchillo et al. (2004) (43). Nach der Rekonstitution wurde das Protein mit PD-10 Säulen entsalzt (Kapitel 2.5.6).

2.5.8 Gelfiltrationsanalyse von Proteinen

Bei der Gel-Chromatographie werden Proteine der Größe nach aufgetrennt. Die Retention von globulären Proteinen in der Gel-Matrix nimmt mit abnehmender Größe der Proteine zu. Durch den Vergleich der Retentionszeit eines Proteins mit Eichproteinen kann das Molekulargewicht eines Proteins oder der Oligomerisierungs-Zustand bestimmt werden.

Eine Sephadex 75 Chromatographiesäule (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) wurde mit den Referenzproteinen Cytochrom c (12,4 kDa), Myoglobin (17,8 kDa), Chymotrypsin (25 kDa) und Albumin (43 kDa) kalibriert. Das Ausschlussvolumen der Säule (v_0) betrug 43 ml. Das Gesamtvolumen (v_t) betrug 126 ml. Der Verteilungskoeffizient wurde mit dem Elutionsvolumen v_e nach folgender Formel berechnet: $K_{AV} = (v_e - v_0) / (v_t - v_0)$. Die Kalibriergerade wurde durch Auftragen der K_{AV} -Werte und der logarithmierten Molekulargewichte der Kalibrierproteine erstellt. Vor der Gelfiltrationsanalyse wurde die Säule mit Puffer W (Kapitel 2.5.3) äquilibriert. Die Elution erfolgte isokratisch mit einer Flussrate von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Der Proteingehalt wurde bei 280 nm verfolgt und 1 ml Fraktionen gesammelt.

2.5.9 Herstellung einer Kaliumsuperoxid-Lösung

Wasserfreies DMSO wurde unter Begasung mit Argon mit Kaliumsuperoxid versetzt (1-2 mM) (127). Die Suspension wurde zu einer Probe von rekonstituierten MM0632 gegeben, die in Puffer ohne DTE gelöst war und das UV/vis-Spektrum von MM0632 photometrisch verfolgt.

2.5.10 Enzymtests

2.5.10.1 MM0631: Disulfid-Reduktase-Aktivität

Die Disulfid-Reduktase-Aktivität von MM0631 wurde in einem Trübungstest mit Insulin als Substrat bestimmt. Insulin besteht aus zwei Peptidketten, die durch intermolekulare Disulfidbrücken kovalent verbunden sind. Durch Ansäuerung mit HCl und anschließender Rücktitration mit NaOH geht das Insulin vollständig in Lösung, so dass die entstandene Lösung klar ist (91, 123). Werden die intermolekularen Disulfidbrücken gespalten, fällt das Insulin aus und die Lösung trübt sich. Diese Trübung kann

photometrisch bei 650 nm verfolgt werden (V550 Photometer, Jasco, Gross-Umstadt). Disulfid-Reduktasen katalysieren diese Reaktion mit DTT als Elektronendonator. Die Reaktion von DTT mit Disulfiden des Insulins ist wesentlich langsamer als die Katalyse durch Disulfid-Reduktasen.

Insulin Stock-Lösungen wurden mit einer Konzentration von 10 mg ml^{-1} in 50 mM Tris pH 8 angesetzt, durch Zugabe von 0,05 M HCl auf pH 2 gebracht und sofort mit 0,05 M NaOH auf etwa pH 8 titriert. Die Lösung wurde vor der Messung frisch angesetzt.

Der Test wurde in einer 0,5 cm Küvette unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Vor dem Test wurde die Küvette mit N_2 begast und mit einem Gummistopfen verschlossen. Als Reaktionspuffer diente K-Phos-Puffer (40 mM, pH 7), mit 1 mM EDTA, der vor der Zugabe von 0,33 mM DTT mit N_2 begast wurde. Vor jedem Versuch wurde der Puffer frisch angesetzt. Die Disulfid-Reduktase-Aktivität von MM0631 wurde in einem Test mit 400 μl Endvolumen bei Raumtemperatur gemessen. Zu dem vergebenen Puffer mit DTT wurde 0,13 mM Insulin gegeben und die Trübung bei 650 nm verfolgt. Nach Bestimmung der Eigenreaktion von DTT und Insulin wurde die Disulfid-Reduktase-Aktivität von MM0631 durch Zugabe von 0 bis 25 μM MM0631 gemessen. Thioredoxin (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Deutschland) diente als Positivkontrolle. Zur Auswertung wurde die Trübung bei 650 nm (V550 Photometer, Jasco, Gross-Umstadt) gegen die Zeit aufgetragen.

2.5.10.2 MM0632: Cytochrom c-Test

Die Superoxid-Reduktase-Aktivität von MM0632 wurde in einem Cytochrom c-Test bestimmt. Als Superoxid-Quelle wurde eine Xanthin-Oxidase eingesetzt, die Xanthin mit Sauerstoff zu Harnstoff, Wasserstoffperoxid und Superoxid umsetzt. Der Test macht sich die Eigenschaft von Superoxid zunutze, Cytochrom c zu reduzieren und die Eigenschaft von Cytochrom c, Elektronen an Superoxid-Reduktasen abzugeben. In einer ersten Phase wurde Cytochrom c reduziert, was photometrisch durch einen Anstieg bei 550 nm verfolgt werden konnte (V550 Photometer, Jasco, Gross-Umstadt). In der zweiten Phase verwendete die zugegebene Superoxid-Reduktase Elektronen von Cytochrom c zur Reduktion von Superoxid. Die Aktivität der Superoxid-Reduktase bewirkte eine Verringerung der Cytochrom c-Reduktionsrate.

Der Cytochrom c-Test wurde ursprünglich für Superoxid-Dismutasen entwickelt. Superoxid-Dismutasen reduzieren das Superoxidmolekül nicht, daher kann die Absorptionsrate bei 550 nm im Cytochrom c-Test mit Superoxid-Dismutasen nicht negativ werden. Das ist ein bedeutender Unterschied zu Superoxid-Reduktasen, die, in geeigneter Menge zugesetzt, das Cytochrom c vollständig oxidieren können. Ein

U Aktivität wurde definiert als die Menge an Enzym, welche eine 50 %ige Inhibition der Reduktion von Cytochrom *c* verursacht.

Das durch die Xanthin-Oxidase und Superoxid-Reduktase entstandene Wasserstoffperoxid wurde durch 250 U Katalase eliminiert, so dass die Enzyme keinen Schaden nahmen. Der Test wurde in 1,5 ml Küvetten unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Als Puffer diente Puffer W (Kapitel 2.5.3), der 250 U ml⁻¹ Katalase, 0,2 mM Xanthin und 40 µM Cytochrom *c* enthielt. Die Menge an Xanthin-Oxidase wurde bei jeder Messung so angepasst, dass die Rate der Cytochrom *c*-Reduktion 0,0025 ± 0,001 min⁻¹ entsprach. Nach einer Minute Inkubation wurde MM0632 zugegeben.

2.5.10.3 MM0632: Rubredoxin-Oxidase-Aktivität

Die Enzyme Ferredoxin:NADP⁺-Oxidoreduktase oder NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase reduzieren Rubredoxin und Desulforedoxin. NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase und Rubredoxin stammten aus *C. acetobutylicum*. MM0632 besitzt eine Rubredoxin-Oxidase- und Superoxid-Reduktase-Aktivität. In aerobem 50 mM MOPS-Puffer wurde Superoxid durch das Xanthin/Xanthin-Oxidase System generiert. Die Aktivität wurde photometrisch anhand der Absorption von NADPH oder NADH bei 340 nm an einem V550 Photometer (Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) ermittelt. Der Test enthielt folgende Komponenten: 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,5), 100 – 250 µM NADPH, 500 U ml⁻¹ Katalase, 0,2 mM Xanthin, 7 µg ml⁻¹ Xanthin-Oxidase, 6 µM Rubredoxin oder 0 – 12 µM Desulforedoxin, 2 µM MM0632 und 0,06 µM Ferredoxin:NADP⁺-Oxidoreduktase oder 0,05 µM NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase. Superoxid-Dismutase (60 U) wurde als Kontrolle verwendet.

2.5.10.4 MM0632: Detektion der Wasserstoffperoxid-Bildung

Wasserstoff wurde nach der Methode von Seaver und Imlay (2001) mit der Meerrettich-Peroxidase detektiert, die 10-Acetyl-3,7-Dihydroxyphenoxazin (Ampliflu Red, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Deutschland) zum Farbstoff Resofurin umsetzt (174). Einem Reaktionsansatz von 250 µl wurde 100 µl einer 0,2 mM Ampliflu Red-Stammlösung in K-Phos-Puffer (50 mM, pH 7,8) und 10 µl einer 0,2 mg ml⁻¹ Meerrettich-Peroxidase Stammlösung zugegeben. Nach Zugabe des Xanthin-Oxidase-Systems (Kapitel 2.5.9.2) stellte sich eine Grundaktivität ein. Anschließend wurde das Superoxid-Reduktase-Systems zugegeben: 250 µM NADH, 0,06 µM NADPH:Ferredoxin-Oxidoreduktase, 2 µM Rubredoxin aus *C. acetobutylicum*, 4 µM MM0632.

2.5.10.5 MM0632: Superoxid-Dismutase-Aktivität

Superoxid-Dismutase-Aktivität wurde mit dem Xanthin/Xanthin-Oxidase System und Nitrotetrazoliumblau detektiert. Superoxid, generiert durch die Xanthin-Oxidase (0,2 mM Xanthin, 3,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Xanthin-Oxidase), reduziert Nitrotetrazoliumblau zu blauem Formazan, das bei 560 nm detektiert wurde. Der Test wurde in einem Volumen von 3 ml in K-Phos-Puffer (40 mM, pH 7), pH 7,6, durchgeführt. Die Aktivität von einem U wurde definiert als Enzymmenge, die notwendig ist, um die Nitrotetrazoliumblau-Reduktion um 50 % zu inhibieren.

2.5.10.6 MM0633: Test mit Hydroxy-Phenazin

Beide Messungen wurden mit einer anaerobisierten Küvette mit K-Phos-Puffer (40 mM, pH 7) mit 5 mM DTE an einem TIDAS-Photometer (Spectralytics, Essingen, Deutschland) durchgeführt. Hydroxy-Phenazin wurde unter Ausschluss von Sauerstoff mit Wasserstoff und Platin als Katalysator über Nacht reduziert. Der Wasserstoff kann durch Austausch der Atmosphäre mit Stickstoff und das Platin durch Sedimentation entfernt werden. In diesem Test diente Hydroxy-Phenazin als Elektronendonator und MM0633 als Akzeptor.

2.5.10.7 MM0633: Test mit Membranen und alternativen Elektronenakzeptoren

Eine Probe des Kofaktors F_{420} wurde mit Stickstoff begast, mit Natriumborhydrid reduziert, dann mit Salzsäure auf pH 1 angesäuert und sofort mit 1 M Natriumhydroxyd auf pH 7 eingestellt. Reduziertes F_{420} wurde in eine anaerobe Küvette mit K-Phos-Puffer (40 mM, pH 7) mit 5 mM DTE überführt. Dem Test wurden 2 - 5 μl Membranpräparation und alternative Elektronenakzeptoren (2 mM) zugegeben. Als Positivkontrolle dienen 5 μl Methylviologen (30 mM) / Metronidazol (50 mM), womit die Aktivität der F_{420} -Dehydrogenase gemessen wird. Die Aktivität wurde bei 420 nm verfolgt.

2.5.10.8 MM0633, MM0634, MM0635: Reduktion durch Ferredoxin:NADP⁺-Oxidoreduktase

Die Reduktion von MM0633, MM0634 und MM0635 wurde anhand der Absorption der Flavine verfolgt (TIDAS-Photometer, Spectralytics, Essingen, Deutschland). Der Enzymtest enthielt folgende Komponenten: NADPH (250 μM), Ferredoxin:NADP⁺-Oxidoreduktase, Ferredoxin aus *Clostridium pasteurianum* in Puffer W (Kapitel 2.5.3).

2.5.10.9 MM0634 und MM0635: Reduktion durch CO-Dehydrogenase

Die Reduktion von MM0634 und MM0635 wurde anhand der Absorption der Flavine verfolgt (TIDAS-Photometer, Spectralytics, Essingen, Deutschland). Die Elektronentransportkette nutzte CO, CO-Dehydrogenase von *Moorella thermoacetica* und Ferredoxin aus *C. pasteurianum*, um die Proteine MM0634 und MM0635 zu reduzieren. Hier wurde K-Phos-Puffer (40 mM, pH 7) mit 5 mM DTE verwendet, MM0635/MM0634 und Ferredoxin zugegeben und der Ansatz 1 min mit CO (5% CO, 95 % N₂) begast. Gestartet wurde die Reaktion durch die Zugabe der CO-Dehydrogenase.

2.5.11 Analyse der Kofaktoren von Proteinen

2.5.11.1 Eisenbestimmung

Zur Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen wurden die folgenden Lösungen verwendet (71).

HCl	1 %
Ammoniumacetat	7,5 %
Ascorbinsäure	4 %
SDS	2,5 %
Ferrozin (3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonat)- 1,2,4-Triazin, Dinatriumsalz)	1,5 %

Die Reaktion basiert auf dem Lösen des Eisens aus dem Protein unter sauren Bedingungen, Reduktion durch Ascorbinsäure und Komplexbildung mit Ferrozin, was eine photometrische Bestimmung erlaubt. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch frisch angesetzt. Die Probe mit einem Volumen von 100 µl wurde mit 100 µl 1 % HCl versetzt und 30 sek bei 25.000 × g zentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 80 °C inkubiert und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurden nacheinander folgende Lösungen zugegeben: 500 µl Ammoniumacetatlösung, 100 µl Ascorbinsäure, 100 µl SDS-Lösung und 100 µl Ferrozin. Die Proben wurden 5 min bei 25.000 × g zentrifugiert und die Absorption bei 593 nm bestimmt. Als Standard wurde Ammoniumeisensulfat verwendet und eine Standardreihe im Bereich von 0 – 60 nmol angefertigt.

2.5.11.2 Schwefelbestimmung

Die Eisen-Schwefel-Zentren der Proteine wurden mit Essigsäure hydrolysiert und der Schwefel als Schwefelwasserstoff freigesetzt. Schwefelwasserstoff wurde als Zinksulfid

gebunden und in Anwesenheit von Fe^{3+} -Ionen mit N,N'-Dimethyl-1,4-phenylendiammoniumdichlorid zu Methylenblau umgesetzt (16, 46). Methylenblau besitzt ein Absorptionsmaximum bei 670 nm und kann somit nach photometrischer Messung zur quantitativen Bestimmung des Schwefelgehalts herangezogen werden. Alle verwendeten Lösungen wurden in Reinstwasser angesetzt. Die Eichgerade wurde mit einer frisch angesetzten Na_2S -Eichlösung erstellt. Dazu wurde ein Sulfidkristall in Wasser, dessen pH-Wert auf pH 9 gebracht wurde, gewaschen, trockengetupft, gewogen und in 50 ml (N_2 -begaster) 0,1 M NaOH-Lösung gegeben. Durch Verdünnung in 50 ml (N_2 -begaster) 0,1 M NaOH-Lösung wurde die Standardlösung hergestellt. Aus dieser wurden die Proben der Standardreihe im Bereich von 0 bis 100 nmol Schwefel pro 100 μl hergestellt.

Test Lösungen:

Lösung A 2 % Zinkacetat-Lösung

Lösung B 0,2 % N,N'-Dimethyl-p-phenylendiammoniumchlorid in 3,75 M H_2SO_4

Lösung C 10 % $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$

Zu 100 μl der Lösung A wurden vorsichtig 100 μl der Probe bzw. des Sulfid-Standards 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 mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt, 5 min bei 25.000 \times g zentrifugiert und der Überstand bei einer Wellenlänge von 670 nm vermessen.

2.5.11.3 Flavinbestimmung

2.5.11.4 Flavin-Präparation

Die Flavine wurden durch Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure freigesetzt (3). Die Proteinproben wurden mit eiskaltem TCA versetzt (5 % Endkonzentration). Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation bei 25.000 \times g für 15 min pelletiert.

2.5.11.5 Quantifizierung von Flavin-Kofaktoren

Die Absorption der Proben wurde bei 450 nm gemessen und der Flavinegehalt über das Lambert-Beer'sche Gesetz mit dem Extraktionskoeffizienten für FMN ($11.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) berechnet.

2.5.11.6 Kofaktorbestimmung mittels HPLC

Die Flavinkofaktoren wurden mit einer HPLC (Knauer Smartline) mit einer Reversed-Phase C-18 Säule (Varian Microsorb-MV, 250 × 4.6 × 1/4) analysiert. Die Flussrate betrug 0,75 ml min⁻¹ mit einem linearen Gradienten von 0-100% Methanol in Ammonium-Acetat-Puffer (50 mM, pH 6,0). Flavine wurden bei 436 nm detektiert (32). FAD (Retentionszeit 11,5 min) und FMN (Retentionszeit 18,0 min) wurden als Standards verwendet.

2.5.12 Chemischer Nachweis von TMA, DMA und MMA

Von mit TMA als Substrat gewachsenen Kulturen wurden 1 ml-Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und die Zellen durch eine Paraffinöl-Zentrifugation von dem Medium getrennt. Den Proben wurde 200 µl Paraffinöl zusetzt und nach 2 min Zentrifugation bei 25.000 × g wurde der Überstand abgenommen. Standardkurven wurden für alle Bestimmungen von 0 bis 50 mM aufgenommen, wobei Standardmedium zur Verdünnung verwendet wurde.

Der TMA-Gehalt wurde mit Folin-Ciocalteu Phenol-Reagenz bestimmt (94). Proteine in dem Zellüberstand wurden durch TCA gefällt (100 µl Probe + 20 µl 10 % TCA, 5 min Inkubation, 5 min 25.000 × g). Zu 50 µl Zellüberstand wurde 783 µl A. dest. 125 µl Na₂CO₃ (20% [w/v]), und 42 µl Folin-Ciocalteu Phenol-Reagenz gegeben. Nach 30 min Inkubation wurde die Absorption bei 745 nm gemessen. Auch höhere DMA- oder MMA-Konzentrationen interferierten nicht mit der TMA-Bestimmung.

DMA wurde mit der Kupfer-Dithiocarbamat-Methode analysiert (61). 100 µl des Zellüberstands wurden in 400 µl A. dest. verdünnt, 50 µl der Lösung A wurde zugegeben (Ammonium-Acetat (20 g), CuSO₄ (0.2 g), NaOH (10 g), und NH₄OH (20 ml), ad 100 ml A. dest). Danach folgte die Zugabe von 500 µl Kohlenstoff-Disulfid in Benzen (5% [v/v]) und 50 µl Essigsäure (30% [v/v]), worauf die Lösung gemixt und für 1 min bei 25.000 × g zentrifugiert wurde. Die Absorption wurde bei 430 nm gemessen.

Das MMA im Überstand reagiert mit Acetylaceton und Formaldehyd in Acetatpuffer (pH 5,6) zu N-Methyl-2,6-Dimethyl-3,5-Diacetyl-1,4-Dihydropyridin, das photometrisch bei 410 nm bestimmt werden kann (198). Zu 50 µl der Probe wurde nacheinander 200 µl Na-Acetat (100 mM, pH 5,6), 300 µl Acetylaceton/Formaldehyd-Lösung (4 ml Acetylaceton, 10 ml Formaldehyd (30 %), 136 ml A. dest.) und 450 µl Aceton gegeben und der Ansatz 5 min bei 95 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und die Absorption bei 410 nm gemessen.

2.6 Bioinformatische Methoden

Sequenzalignments wurden mit ClustalW und COBALT durchgeführt (119, 151). Für die Datenbankrecherchen wurden verschiedene BLAST-Programme verwendet (Basic Local Alignment Search Tool) (6). Transmembrandomänen wurden mit Memsat3 und Signalpeptide mit dem Programm SignalP 3.0 analysiert (17, 112). Die nicht-redundanten Proteindatenbanken wurden über die Internetseiten von KEGG und NCBI abgerufen (<http://www.genome.jp/kegg/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Substratumsetzung in *Methanosarcina mazei*

Methanproduzenten können in die hydrogenotrophen Methanarchaea, die strikt auf Wasserstoff und CO₂ oder Formiat angewiesenen sind, und in die methylotrophen Methanarchaea eingeteilt werden. Die methanogenen Organismen mit der größten metabolischen Vielseitigkeit gehören der Gattung *Methanosarcina* an. So können *Ms. mazei* und mehrere andere *Methanosarcina*-Stämme neben einer hydrogenotrophen Wachstumsweise auch methylierte C₁-Verbindungen wie Methylamine, Methanol oder Acetat als Substrate verwenden (56). *Ms. mazei* kann die Methylamine TMA, DMA und MMA verwerten, die zu den Endprodukten CH₄, CO₂ und NH₃ umgesetzt werden. TMA wird dabei sequenziell demethyliert (Abbildung 3).



Abbildung 3: Reaktionsfolge des Abbaus von Methylaminen.

In dem zentralen Stoffwechselweg der Methanogenese werden von vier Methylgruppen drei zu CH₄ reduziert, wodurch das Heterodisulfid als Elektronenakzeptor der Atmungskette gebildet wird. Eine Methylgruppe wird zu CO₂ oxidiert, um reduzierte Elektronendonatoren zu generieren. Die membrangebundenen Komponenten der Atmungskette katalysieren den Elektronentransport von reduzierten Elektronendonatoren auf das Heterodisulfid, der schließlich zum Aufbau eines Protonen-Gradienten führt (55). Das Membranpotential wird anschließend von der A₁A₀-ATP-Synthase zur ATP-Synthese genutzt.

Der Abbau von methylierten Aminen wird durch die Übertragung der Methylgruppe auf ein Corrinoid-haltiges Trägerprotein initiiert (Abbildung 4). Dieser Methyltransfer wird durch eine Substrat-spezifische Methyltransferase 1 (MT1) katalysiert. Die MT1 für TMA ist durch das Gen *mttB* kodiert, die MT1 für DMA durch das Gen *mtbB* und die MT1 für MMA durch das Gen *mtmB*. Jede der drei MT1-Typen überträgt die

3.1.1 Analyse des TMA-Verbrauchs und der DMA- und MMA-Bildung von wachsenden Zellen

Es war noch nicht bekannt, welche Rolle die verschiedenen Isoenzyme der MT1- und Corrinoid-Enzyme bei der Metabolisierung von TMA übernehmen. Die Möglichkeit bestand, dass einigen Isoenzymen eine vorherrschende Rolle zukommt, oder die Gene abhängig von der Wachstumsphase oder anderen externen Stimuli reguliert werden. Zur Klärung dieser Frage war es zunächst wichtig zu untersuchen, auf welche Weise der TMA-Abbau vollzogen wird. Bei Wachstum von *Ms. mazei* mit TMA werden durch die Methyltransfer-Reaktionen nacheinander DMA und MMA gebildet. Es ist jedoch noch ungeklärt, ob die Zellen das TMA-Molekül sofort zu CH_4 , CO_2 und NH_3 abbauen, oder ob ein sukzessiver Abbau mit einer Anhäufung der Zwischenprodukte DMA und MMA im Medium erfolgt.

Daher wurden Wachstumsexperimente mit TMA als Substrat durchgeführt. Die Wachstumsparameter von *Ms. mazei* wurden durch regelmäßiges Messen der optischen Dichte bestimmt. Zudem wurden die Konzentrationen von TMA und der Abbauprodukte DMA und MMA im Kulturüberstand zu verschiedenen Zeitpunkten nach Pelletierung der Zellen ermittelt. Der TMA-Verbrauch und die DMA- und MMA-Bildung während des Wachstums sind in Abbildung 5 dargestellt.

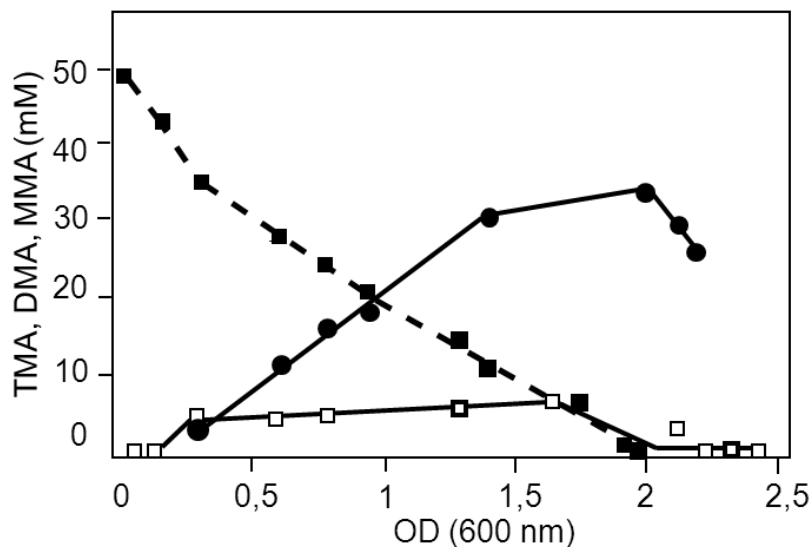


Abbildung 5: TMA-Verbrauch und DMA- sowie MMA-Bildung bei Wachstum von *Ms. mazei* mit TMA; ● MMA; □ DMA; ■ TMA.

Die anfängliche TMA-Konzentration von 50 mM in dem Medium nahm kontinuierlich ab, bis das TMA vollständig verbraucht war und die Kulturen eine finale OD_{600} von 2,2

erreicht hatten. Die Untersuchung des Kulturüberstandes auf das erste Zwischenprodukt, DMA, ergab, dass es in der frühen Wachstumsphase gebildet wurde. DMA wird demnach aus den Zellen in das Medium transportiert. Die Konzentration von DMA stieg in den Kulturen ab einer OD_{600} von etwa 0,3 bis zu einer Konzentration von 7,5 mM an. Die DMA-Konzentration blieb bei diesem Wert konstant, bis die späte exponentielle Phase bei einer OD_{600} von etwa 1,7 erreicht wurde. Ab dieser Wachstumsphase ging die detektierte DMA-Menge im Überstand zurück und war ab einer OD_{600} von 2 auf null gesunken. Die Zellen gaben interessanterweise auch große Mengen MMA in das Medium ab. Die Konzentration des letzten Zwischenprodukts nahm nahezu über die komplette exponentielle Wachstumsphase bis auf eine Konzentration von 35 mM zu, was etwa zwei Dritteln der gesamten konsumierten Menge an TMA entsprach. Als die Kultur eine OD_{600} von 2 erreichte, nahm die im Medium nachzuweisende Mengen an MMA ab und war mit dem Beginn der stationären Phase nicht mehr nachzuweisen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *Ms. mazei* große Mengen des intermediären Methylamins DMA und im noch größeren Maßstab MMA in das Medium abgibt und erst in der späten Phase des Wachstums wieder in die Zelle transportiert und zu CH_4 und CO_2 umsetzt.

3.1.2 Analyse des Transkriptionsprofils der Methyltransferase-Gene

Der TMA-Verbrauch und die Bildung der Intermediate spiegelt die Aktivität der TMA-, DMA- und MMA-spezifischen Methyltransferasen und Corrinoid-Proteine wider. Durch die Quantifizierung der mRNA dieser Proteine sollte analysiert werden, ob das Expressionsprofil der Gene der TMA-, DMA- und MMA-spezifischen MT1 und Corrinoid-Enzyme dem Bild entsprach, das durch die chemische Produktanalyse gewonnen wurde. Außerdem wurde untersucht, welche Rolle den einzelnen Isoenzymen beim Wachstum auf TMA zukommt. Zu diesen Zwecken wurde Gesamt-RNA aus *Ms. mazei*-Kulturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Wachstums isoliert und die relative Transkriptzahl der entsprechenden Gene durch qRT-PCR-Experimente ermittelt. Als Referenz dienten zwei konstitutiv exprimierte Gene, das Gen der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, *gap* (*mm2782*), und das Gen der großen ribosomalen Untereinheit, *Isu* (*mm2536*).

Die Gene der MT1-Enzyme und der dazu gehörigen Corrinoid-Proteine sind in dem Genom von *Ms. mazei* stets direkt hintereinander kodiert. Für mehrere MT1-Enzyme und Corrinoid-Proteine aus *Ms. barkeri* wurde nachgewiesen, dass die entsprechenden Gene ein Operon bilden, daher kann auch bei *Ms. mazei* davon ausgegangen werden, dass diese Gene co-transkribiert werden (153). Darüber hinaus bilden in *Ms. mazei* die

Gene *mttBC1* (TMA-abhängiger Methyltransfer) und *mtbBC1* (DMA-abhängiger Methyltransfer), die in unmittelbarer Nachbarschaft zusammen mit dem Permease-Gen *mttP1* lokalisiert sind, ein polycistronisches Transkript. Für die homologen Gene aus *Ms. barkeri* wurde nachgewiesen, dass sie ein Operon bilden (153). Da die beiden Gene *mttC1* und *mtbC1* aus *Ms. mazei* bei allen getesteten Wachstumsbedingungen eine sehr ähnliche Expression zeigten, kann angenommen werden, dass sie ebenfalls in einem Operon organisiert sind (Abbildung 6).

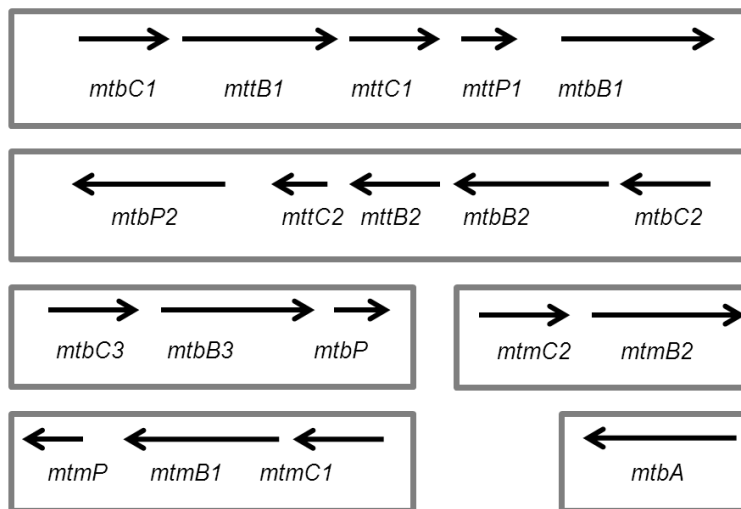


Abbildung 6: Organisation der Gene für den Methyltransfer von TMA, DMA und MMA auf Coenzym M. Im Folgenden sind die Gennummern angegeben: *mtbC1*, MM1687; *mttB1*, mm1688/mm1689; *mttC1*, mm1690; *mttP1*, mm1691/mm1692; *mtbB1*, mm1693/mm1694; *mttP2*, mm2045/mm2046; *mttC2*, mm2047; *mttB2*, mm2048/mm2049; *mtbB2*, mm2050/mm2051; *mtbC2*, mm2052; *mtbC3*, mm2961; *mtbB3*, mm2962/mm2963; *mtbP*, mm2964; *mtmC2*, mm3334; *mtmB2*, mm3335; *mtmP*, mm1434/mm1435; *mtmB1*, mm1436/mm1437; *mtmC1*, mm1438; *mtbA*, mm1439. Schwarze horizontale Pfeile zeigen die Orientierung und Länge der Gene; die Umrandungen markieren Operonstrukturen.

Die kodierenden Bereiche der Isoenzyme zu diesen Proteinen, also *mtbBC2*, *mttBC2*, und *mtbP2*, bilden dementsprechend ebenfalls ein Operon. Die dritten Isoenzyme der DMA-verwertenden Enzyme, MtbBC3, sind mit einer Permease MtbP, die wahrscheinlich DMA-Abhängig ist, in einem Gencluster kodiert. Das Schema, dass sich die Gene für die MT1-Enzyme und Corrinoid-Proteine in einem Operon befinden, setzt sich bei den MMA-spezifischen Enzymen fort, wobei nur die Gene des Isoenzym MtmBC1 mit einer Permease MtmP1 in einem Operon kodiert sind, während das Operon *mtmBC2* keine Permease enthält. Die Operon-Struktur der Gene der MMA-

spezifischen Enzyme wurde in *Ms. barkeri* experimentell bestätigt (153). Das Gen *mtbA* bildet eine monocistronische Transkriptionseinheit.

Die qRT-PCR-Analyse der Methyltransferase-Gene ergab zum Teil eine nur sehr geringe Kopienzahl der Transkripte. Die Transkriptmenge der Gene *mtbC2*, *mttB2*, *mttC2*, *mtbC2* und *mttC2*, war verglichen mit den Zentralgenen *gap* und *Isu* sehr gering. Diese Gene zeigten auch keine abgestufte Expression in Abhängigkeit von der Wachstumsphase, das heißt in der frühen, mittleren und späten exponentiellen Phase waren die Transkriptmengen gleich. Die Transkripte des Operons *mtmBC2* waren ebenfalls kaum nachzuweisen. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Veit *et al.* (2006) überein, die zeigten, dass das Operon *mttmBC2* nur unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen exprimiert wird (195).

Die qRT-PCR Experimente zeigten jedoch auch intensiv regulierte Gene (Abbildung 7).

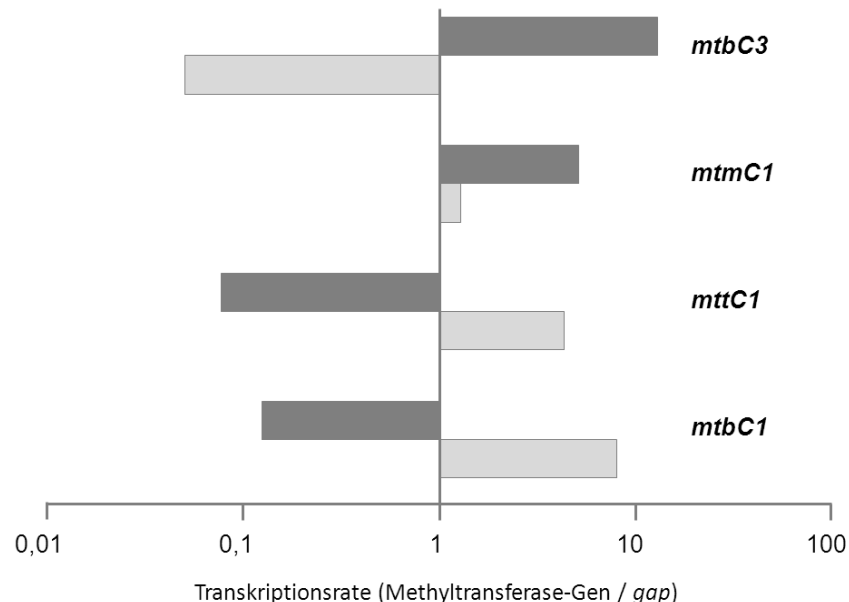


Abbildung 7: Relative mRNA-Menge von Genen TMA-gewachsener Zellen zu unterschiedlichen Wachstumsphasen. Δ Ct-Werte wurden mit der relativen Häufigkeit der mRNA von *gap* als Standard berechnet. Hellgraue Balken zeigen das Transkriptionslevel der Gene in der frühen bis mittleren exponentiellen Phase ($OD_{600} = 0,5 - 1,7$). Dunkel graue Balken zeigen das Transkriptionslevel in der späten exponentiellen Phase ($OD_{600} \geq 2$).

So wurden in der frühen bis spät-exponentiellen Phase des Wachstums große Mengen polycistronischer mRNA der Gene *mtbC1*, *mttB1*, *mttC1*, *mtbB1*, *mttC1* nachgewiesen, die für die Methyltransferasen und Corrinoid-Proteine der TMA- und DMA-Verwertung, sowie eine Permease kodieren. In den Zellen war etwa 10 Mal so viel mRNA dieses

Operons enthalten als von den Zentralgenen *gap* und *Isu*. In der späten exponentiellen Phase ($OD_{600} \geq 2$) sah das Transkriptionsmuster anders aus. Hier war die Expression des vormals stark exprimierten Operons *mttBC1* etwa um den Faktor 100 reduziert, während die relative Menge der Transkripte von *mtbBC3* (*mm2961* – *mm1438*) um den Faktor 100 gesteigert war. Die Kopienzahl der mRNA des Operons *mtmBC1* (*mm1434* – *mm1438*) war in der späten exponentiellen Phase fünf Mal so hoch wie in der frühen und mittleren exponentiellen Phase. Interessanterweise befindet sich in allen Operons, für die hier eine Wachstumsphasen-abhängige Regulation gefunden wurde, also *mttBC1-mtbBC1*, *mtmBC1 mtbBC3*, auch ein Gen einer Permease.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *Ms. mazei* TMA stufenweise abbaut und MMA erst verstoffwechselt, wenn TMA und DMA verbraucht sind. Die Transkriptions-Analyse hat gezeigt, dass in der späten Wachstumsphase die Gene für die Isoenzyme MtbBC3 und MtmBC1 für die DMA- und MMA- Verwertung verstärkt transkribiert wurden, während die Gene für die zuvor bevorzugten MttBC1/MtbBC1 Isoenzyme für die TMA und DMA-Umsetzung herunterreguliert waren.

3.2 Untersuchungen zum Gencluster *mm0629 – mm0636* und der korrespondierenden Proteine als potentielle Schutzfaktoren vor Sauerstoffradikalen in *Ms. mazei*

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung von Proteinen, deren Gene in dem Genom von *Ms. mazei* in dem Gencluster *mm0629 – mm0636* in derselben Leserichtung organisiert sind (58). Mit Hilfe von Computerprogrammen wurden die Gene bzw. die abgeleiteten Aminosäuresequenzen näher untersucht. Es zeigte sich, dass fast alle Proteine Motive aufwiesen, die an der Koordination von prosthetischen Gruppen (Eisen- und Eisenschwefel-Cluster, Flavine und Hämgruppen) beteiligt sind. Zudem hatten Transkriptom-Analysen ergeben, dass diese Gene bei Wachstum auf Acetat vermehrt exprimiert werden (93). Es lag daher die Vermutung vor, dass die Proteine am Elektronentransport bei der Acetatverwertung beteiligt sind. Eine weitere Hypothese war, dass die Genprodukte eine Schutzfunktion vor Sauerstoff und dessen Radikalen ausüben könnten. Da beide der zuvor dargestellten zellulären Funktionen bislang wenig untersucht waren, sollten die Eigenschaften der Proteine MM0629 – MM0636 näher charakterisiert werden.

Im den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse für die einzelnen Proteine behandelt. Die verschiedenen Proteine sollten in *Escherichia coli* (*E. coli*) heterolog produziert werden, um sie für eine *in vitro* Untersuchung zugänglich zu machen. Die Untersuchung sollte letztlich Aufschluss über die Funktion der Proteine in *Ms. mazei* liefern.

3.2.1 Transkriptionsanalyse des Operons *mm0629 – mm0636*

In einem ersten Experiment wurde überprüft, ob die Gene zusammen in einem Operon transkribiert werden, oder ob es sich um mehrere Transkriptionseinheiten handelt. Für diese Analyse wurde der mRNA-Pool von mit TMA-gewachsenen Kulturen isoliert und über eine reverse Transkription cDNA synthetisiert. Hierbei wurden die Gen-spezifischen Primer verwendet, die auch für die Klonierung der Gene eingesetzt wurden.

Mit der cDNA als Matrize wurden PCR-Reaktionen durchgeführt. Die Vorwärts- und Rückwärts-Primer wurden so gewählt, dass die Amplifikate zwei oder mehrere Gene überspannten (Abbildung 8 A). Wenn aus dem Genombereich von *mm0629 – mm0636* durch die Transkription eine einzige polycistronische mRNA gebildet wird, müsste sich

für jede Primerkombination ein Produkt nachweisen lassen. Sollte jedoch mehr als ein Operon vorhanden sein, könnte eine Gen-überspannende PCR nicht gelingen. In Abbildung 8 sind das Gencluster und die Primer dargestellt, mit denen PCR-Produkte nachgewiesen wurden.

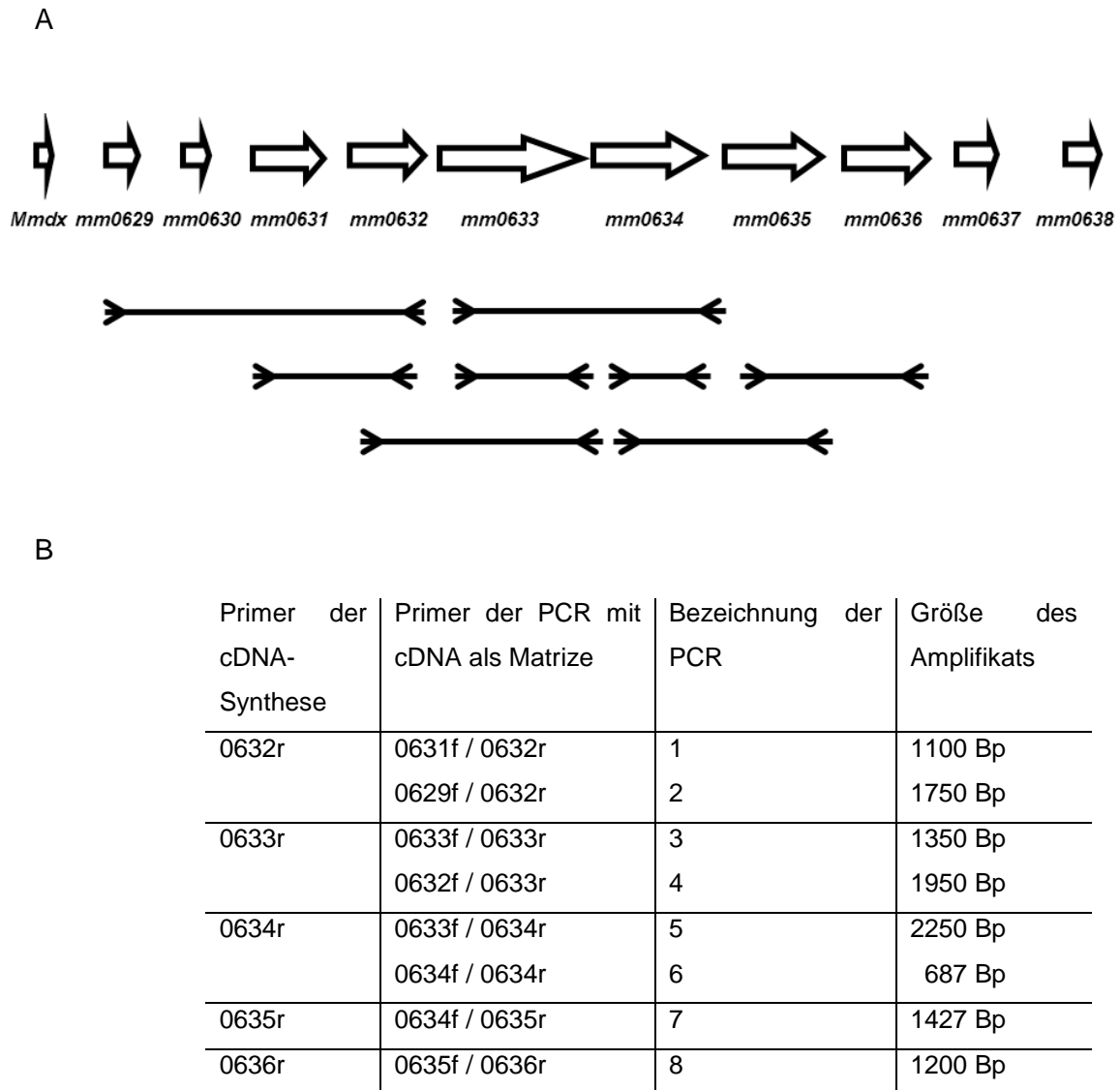


Abbildung 8: Analyse der Operonstruktur mittels reverse Transkription und PCR. A: Die Abbildung zeigt das Gencluster *mmdx* – *mm0638* und das Schema darunter die amplifizierten cDNA-Bereiche. Die Primer sind als Pfeile gekennzeichnet. B: Auflistung der Primer, die für die Erstellung von cDNA verwendet wurden. Bei der Synthese von cDNA wurde der Bereich stromabwärts von der Primer-Position revers transkribiert. Außerdem sind die Primer der PCR auf cDNA angegeben, die in Teil A als Pfeile gezeigt sind. Darüber hinaus ist die Bezeichnung der PCR-Reaktionen angegeben, die in Abbildung 9 dargestellt sind, und die Größe des erwarteten Amplifikats.

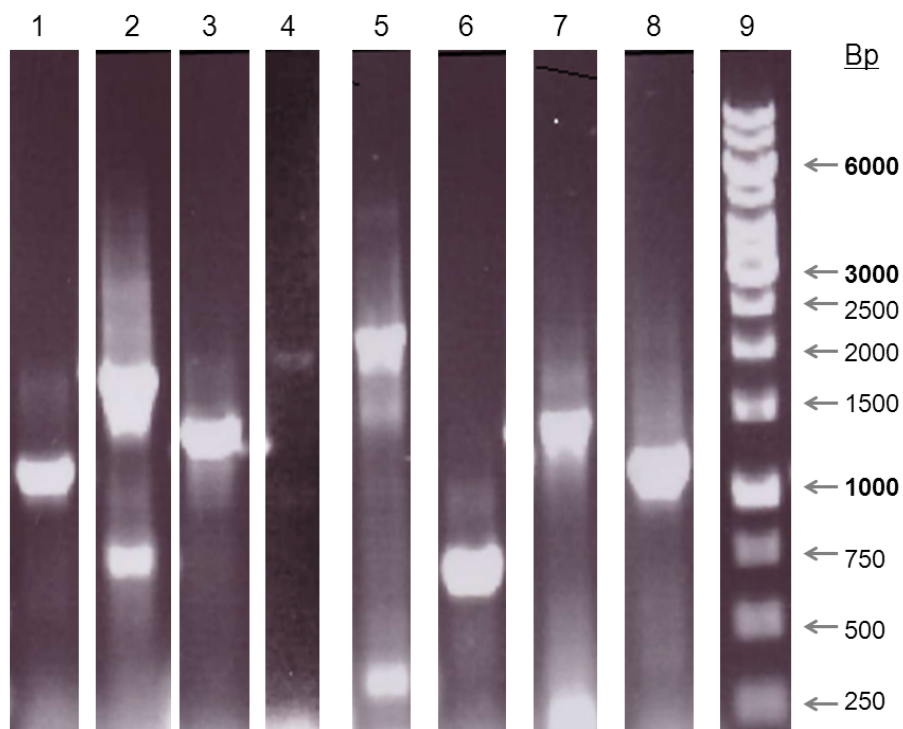


Abbildung 9: Amplifikate nach PCR mit cDNA als Matrize. Die Primer und die erwarteten Größen der Amplifikate sind in Abbildung 8 aufgeführt: (1) 0631f / 0632r, (2) 0629f / 0632r, (3) 0633f / 0633r, (4) 0632f / 0633r, (5) 0633f / 0634r, (6) 0634f / 0634r, (7) 0634f / 0635r, (8) 0635f / 0636r, (9) 1 kb-Marker.

Abbildung 9 zeigt, dass mit jeder Primerkombination ein Amplifikat gewonnen wurde. Daraus ließ sich zunächst schlussfolgern, dass es in *Ms. mazei* zu einer Expression der Gene kam. Darüber hinaus zeigte das Experiment, dass die Gene *mm0629* – *mm0636* in einem Operon organisiert sind. Von den Genen *mm0637* und *mm0638* konnte keine mRNA nachgewiesen werden. Die Transkription des Genclusters stoppt demnach nach dem Gen *mm0636*. Bei der genauen Analyse der Gensequenz viel auf, dass die Gene *mm0637* und *mm0638* Bruchstücke eines vormals größeren offenen Leserasters sind, in dessen Sequenz im Laufe der Evolution des Stammes ein Stoppcodon entstanden ist. In *Ms. acetivorans* ist das homologe Gen als Ganzes vorhanden, und nicht in zwei Leserastern gespalten (75). Daher sind die Proteine MM0637 und MM0638 in *Ms. mazei* wahrscheinlich nicht funktional und die entsprechenden Gene werden auch nicht transkribiert.

3.2.2 Untersuchung des Proteins MMDx

3.2.2.1 Sequenzvergleich von MMDx

Neben dem Genom von *Ms. mazei* sind noch die Genome von *M. acetivorans* und *Ms. barkeri* aus der Gattung *Methanosarcina* bekannt (58, 75, 130). Bei *Ms. acetivorans* und *Ms. barkeri* beginnt das hier untersuchte Operon *mm0629* – *mm0636* nicht mit dem zu *mm0629* homologen Gen, sondern mit einem kleinen offenen Leseraster, der für ein Desulfiredoxin kodiert. Bei der Untersuchung des Operons in *Ms. mazei* wurde in der entsprechenden Region ebenfalls dieses 126 Basenpaare große Gen gefunden. Offensichtlich wurde es bei der automatischen Annotierung des *Ms. mazei*-Genoms übersehen, wahrscheinlich bedingt durch die geringe Länge des Gens.

Die Annotierung des 4.1 Mega-Basenpaare umfassenden Genoms von *Ms. mazei* ergab 3,371 offene Leseraster, wobei in nur 75,15 % der Sequenz Informationen kodiert sind (58). Der Anteil an Protein-kodierenden Genen konnte nach einer Studie von Jäger *et al.* (2009) um 1,3 % nach oben korrigiert werden, nachdem das Transkriptom von *Ms. mazei* analysiert und 40 neue offene Leseraster durch die Sequenzierung von cDNA entdeckt wurden (98). In dieser Studie wurden die Transkriptionsstartpunkte von 876 mRNAs gefunden, darunter befand sich auch das Transkript des hier untersuchten Operons, dessen Transkriptions-Startpunkt an der Basenposition 760.420 liegt. Der Beginn des in *Ms. mazei* neu identifizierten Gens für das Desulfiredoxin lag an Basenposition 760.519 und damit hinter dem Transkriptionsstartpunkt des Operons. Das neue Gen ist somit Bestandteil des untersuchten Operons und wird fortan als *mmdx* bezeichnet. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz ist in Abbildung 10 dargestellt.

```
GTG GGC GTA TCC AAG AAA GGA GAA AAA TAC CTC TGC GAG ATC TGC GGT
M   G   V   S   K   K   G   E   K   Y   L   C   E   I   C   G

AAT GAG GTC ACC GTA ACA AAA GTC GGA GGC GGA ACG CTT GTT TGC TGT
N   E   V   T   V   T   K   V   G   G   G   T   L   V   C   C

GGG GAG GAA ATG ACC CTG ATA GAG GAA TAA
G   E   E   M   T   L   I   E   E   Stopp
```

Abbildung 10: Die Nukleotidsequenz von *mmdx* ist in der 5' → 3' Richtung abgebildet. Die Aminosäuren sind unter dem ersten Nukleotid der Codons im Einbuchstabencode angegeben. Das Startcodon besteht aus der Nukleotidfolge GTG, das Stoppcodon TAA wurde mit Stopp bezeichnet.



Abbildung 11: Alignment der Aminosäuresequenzen von Desulfiredoxin aus *Ms. mazei* und homologen Proteinen oder Protein-Domänen. Die Genbank-Zugangsnummern sind im Folgenden aufgeführt. MA4664: *Methanosarcina acetivorans* C2A, Desulfiredoxin (NP_618606); Mmah_1514: *Methanohalophilus mahii* DSM 5219 Desulfiredoxin (YP_003542655); Dx: *Desulfovibrio gigas* Desulfiredoxin (1DXG_A); Ddes_2010: *Desulfovibrio desulfuricans*, Desulfoferrodoxin (YP_002480584); AF0833: *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304, Desulfoferrodoxin (NP_069667). Vier Cysteine binden das [Fe(SCys)₄]-Zentrum in einem CXXCX₁₅CC-Motiv. Sie sind durch drei Pfeile gekennzeichnet. Die Aminosäuren des [Fe(NHis)₄(SCys)]-Zentrums am C-Terminus der Desulfoferrodoxine aus *D. desulfuricans* und *A. fulgidus* sind schwarz hervorgehoben.

Wie das Alignment in Abbildung 11 zeigt, war MMDx zu 83 % identisch mit dem homologen Protein aus *Ms. acetivorans* und zu 73 % identisch zu dem Protein aus *Methanohalophilus mahii*. Die Desulfiredoxine aus methanogenen *Archaea* weisen eine hohe Ähnlichkeit zu Desulfiredoxin aus *Desulfovibrio gigas* auf. So ist die Aminosäure-Sequenz von MMDx zu 55 % mit dem *D. gigas* Desulfiredoxin identisch (33). Die vier Cysteine, die zur Ligation des [Fe(SCys)₄]-Zentrums von Desulfiredoxin nötig sind, sind vollständig in den Sequenzen konserviert. Ein Vergleich des Proteins mit weiteren Aminosäuresequenzen aus der NCBI-Proteindatenbank zeigte, dass MMDx der N-terminalen Domäne von Desulfoferrodoxinen sehr ähnlich war (Abbildung 11). Desulfiredoxine sind kleine Elektronen-übertragende Proteine mit einem [Fe(SCys)₄]-Zentrum. Desulfoferrodoxine haben eine sehr ähnliche Bezeichnung wie die Desulfiredoxine, sind jedoch anders aufgebaut. Die Desulfoferrodoxine aus *A. fulgidus* und dem δ -Proteobakterium *Desulfovibrio desulfuricans* besitzen die

Desulforedoxin-ähnliche Domäne an ihrem N-Terminus, dem sich am C-Terminus eine zweite Domäne mit einem für Desulfoferrodoxine typischen $[\text{Fe}(\text{NHis})_4(\text{SCys})]$ -Zentrum anschließt. Auf die Desulfoferrodoxine (Superoxid-Reduktasen vom Typ II) wird in der vorliegenden Arbeit in dem Abschnitt der Ergebnisse von MM0632 (Kapitel 3.2.4) ausführlich eingegangen.

Desulforedoxine sind den Rubredoxinen sehr ähnlich, da beide Proteine ein $[\text{Fe}(\text{SCys})_4]$ -Zentrum binden. Desulforedoxine (4-5 kDa) sind noch kleiner als Rubredoxine (6-8 kDa) und besitzen ein verschiedenartiges Cystein-Motiv und damit auch unterschiedliche spektroskopische Eigenschaften, was beide Proteine als eigenständige Proteinklassen kennzeichnet (18).

3.2.2.2 Charakterisierung des rekombinanten Proteins MMDx

Das Gen *mmdx* wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pPR-IBA1 kloniert. In diesem Vektor liegt das Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors und wird am C-Terminus mit der Sequenz des Strep-Tags fusioniert. Ein Kontrollverdau und die Sequenzierung des Konstrukts bestätigten den Erfolg der Klonierung. Die Expression des Gens wurde in *E. coli* BL21 durch 0,1 mM IPTG induziert und die Kultur über Nacht bei 28°C inkubiert. *Ms. mazei*-Desulforedoxin wurde affinitätschromatographisch aufgereinigt. Das Protein wies eine rote Farbe auf, wenn es aerob gereinigt wurde. Bei der anaeroben Reinigung war das Protein farblos, was darauf hindeutet, dass es im reduzierten Zustand vorlag.

Die Überprüfung der Präparation mittels SDS-PAGE bestätigte die Reinheit des Proteins (Abbildung 12 B). Nach einer Silberfärbung war nur eine einzige deutliche Bande zu erkennen, allerdings entsprach die anhand der Markerproteine errechnete Größe nicht der theoretischen Größe des Proteins. Für das 42 Aminosäuren große Desulforedoxin wurde eine molekulare Masse von 4,3 kDa vorausgesagt, wobei der Strep-Tag die Masse um etwa 1 kDa auf 5,5 kDa erhöht. In einer SDS-PAGE lief das Protein eine Strecke, die einem Protein von etwa 14 kDa entsprach. Es wurden verschiedene alternative Protokolle getestet, die speziell für die Größenbestimmung von kleinen Proteinen geeignet waren. In diesen Ansätzen wurde das Protein bis zu 30 min bei 95 °C gekocht oder mit β -Mercaptoethanol versetzt, um es komplett zu denaturieren und zu reduzieren. Anstelle von SDS wurde Lithiumdodecylsulfat (LDS) verwendet. Die Versuche änderten jedoch nichts an dem Migrationsverhalten des Desulforedoxins bei einer LDS/SDS-PAGE. Der Transfer des Proteins auf eine Trägermembran durch einen Western-Blot scheiterte ebenfalls. Nur nach einem

direkten Transfer des Proteins auf eine Nitrocellulosemembran (Dotblot) konnte der Nachweis des Strep-Tags mit einer Antikörperfärbung erbracht werden.

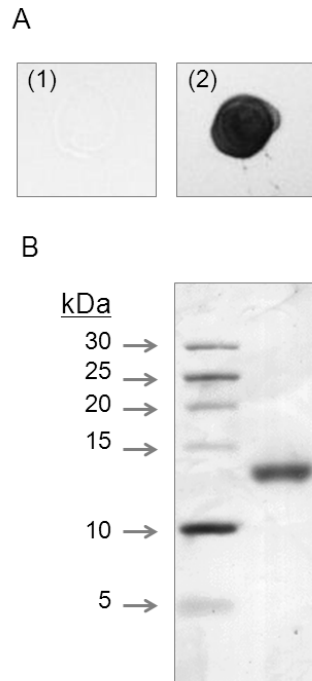


Abbildung 12: SDS-PAGE-Analyse von heterolog produzierten Desulforedoxin. (A) Dotblot von MMDx und Nachweis durch eine Antikörper-Färbung des Strep-Tags: (1) 1 µg BSA als Negativkontrolle; (2) 2 µg MMDx. (B) SDS-PAGE (18 %) von MMDx und Nachweis durch Silberfärbung. Die Markerbanden (ungefärbte Proteinleiter mit kleinen Proteinen) haben von oben nach unten folgende Größen: 30 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa, 10 kDa, 5 kDa.

Da das Protein ohne Kontaminationen aufgereinigt und der Strep-Tag nachgewiesen werden konnte, und das Protein zudem eine charakteristische Absorption aufwies, konnte davon ausgegangen werden, dass das Desulforedoxin erfolgreich produziert wurde. Wahrscheinlich ist die SDS-Bindefähigkeit des Proteins so geschaffen, dass die Ladung und damit die zurückgelegte Strecke des Proteins im SDS-Gel zu gering war, wie es auch für andere Proteine in der Literatur beschrieben ist (74). Eventuell bewirkte die geringe Größe, dass das Protein mit einem Western-Blot nicht nachgewiesen werden konnte.

In Abbildung 13 ist das UV/Vis-Spektrum des aerob gereinigten Proteins dargestellt. Das Spektrum zeigte ein Maximum bei 370 nm und eine breite Absorption im Bereich von 450 bis 650 nm mit einem weiteren Maximum bei 510 nm. Die Absorption bei 370 und 500 nm verschwand langsam, wenn das Desulforedoxin mit DTE inkubiert wurde.

Abbildung 13 zeigt das Spektrum von Desulforedoxin zu Beginn der Reaktion und 9 und 28 min nach der Zugabe von DTE.

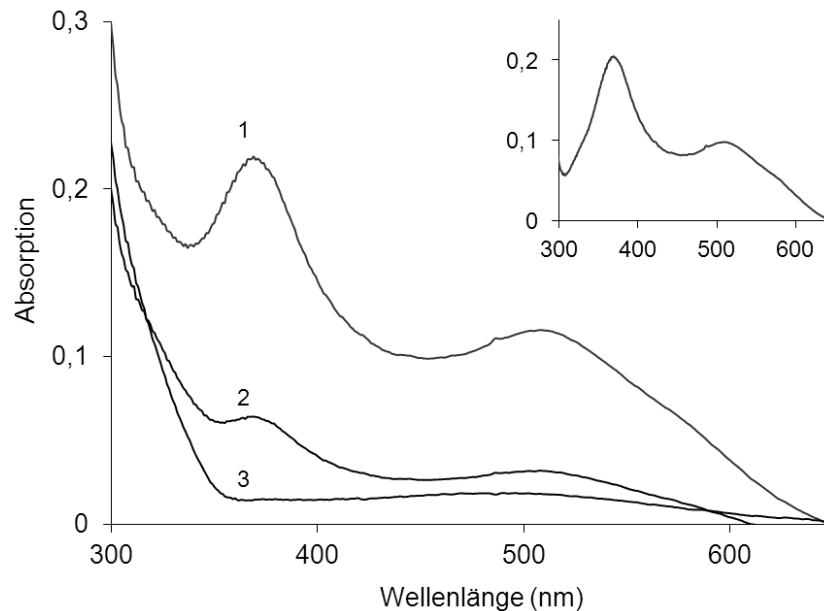


Abbildung 13: UV/Vis-Spektrum von Desulforedoxin (6 mg ml^{-1}). Dargestellt ist das UV/Vis-Spektrum nach Oxidation durch Wasserstoffperoxid (1), sowie neun Minuten (2) und 28 Minuten (3) nach der Zugabe von 5 mM DTE. Das eingefügte Spektrum zeigt das Differenzspektrum des oxidierten minus reduzierten Zustands.

Eine Anaerobisierung des Puffers durch N_2 -Begasung oder enzymatisch Umsetzung des Sauerstoffs genügte auch schon zur Ausbleichung des Spektrums. Wurde das starke Reduktionsmittel Natriumdithionit zugegeben, blich das Enzym in Sekundenbruchteilen aus. Von Rubredoxin aus *Clostridium formicaceticum* ist bekannt, dass es als effektiver Elektronenakzeptor für die CO-Dehydrogenasen aus *Acetobacterium woodii* und *Moorella thermoacetica* fungieren kann, während für Desulforedoxin diese Reaktion noch nicht nachgewiesen wurde (161). In dieser Arbeit wurde versucht, einen Elektronentransport von CO über die CO-Dehydrogenase aus *Moorella thermoacetica* auf Desulforedoxin zu etablieren. Die Aktivität sollte über die Absorption des Desulforedoxins bei 510 nm verfolgt werden. Dieser Test erwies sich als schwierig, was hauptsächlich durch die schnelle Reduktion von Desulforedoxin durch DTE im Reaktionsansatz verschuldet wurde.

Die CO-Dehydrogenase benötigt für ihre Aktivität reduzierte, anaerobe Bedingungen. Nach dem Transfer des Enzyms in den Reaktionsansatz und zu Beginn der aktiven Phase des Enzyms war das Desulforedoxin bereits reduziert, und die Reduktionsrate durch CO und CO-Dehydrogenase konnte nicht bestimmt werden. Da Desulforedoxin auch unter anaeroben Bedingungen schon ausbleich, brachte auch der Ersatz des DTE durch ein Sauerstoff eliminierendes Enzymsystem aus Glucose (3 mM) und Glukoseoxidase (4 U ml⁻¹), die Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid umsetzt, und Katalase (250 U ml⁻¹) keine Verbesserung. Die Elektronenübertragung von der CO-Dehydrogenase auf MMDx konnte somit nicht nachgewiesen werden.

In einem zweiten Enzymtest wurde die NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase eingesetzt. Dieses Enzym konnte MMDx reduzieren. In dem Test wurde MM0632 und das Superoxid generierende System aus Xanthin und Xanthin-Oxidase als Elektronenakzeptor für MMDx verwendet. So konnte nachgewiesen werden, dass MM0632 als nativer Elektronenakzeptor für MMDx in *Ms. mazei* fungiert. Dies war der erste Nachweis einer Interaktion der Proteine, die in dem Operon *mmdx – mm0636* kodiert sind. MM0632 gibt die Elektronen an Superoxid weiter, so dass in diesem Test eine Elektronentransportkette von drei Enzymen mit NADH als Donor und Superoxid als Akzeptor etabliert werden konnte. In Kapitel 3.2.4 wird ausführlich auf die Funktion von MM0632 in diesem Test eingegangen.

3.2.3 Untersuchung des Proteins MM0631

3.2.3.1 Sequenzvergleich von MM0631

Das Protein MM0631 ist ein kleines Protein mit 115 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 12,5 kDa. Die Sequenz enthält vier Cysteine, wovon sich Cys₃₉ und Cys₁₀₇ relativ nah an den Enden der Polypeptidkette befinden. Zwei weitere befinden sich in einem charakteristischen C₆₇XXC₇₀-Motiv.

Abbildung 14 zeigt einen Sequenzvergleich zwischen MM0631, den homologen Proteinen aus *Ms. barkeri* und *Ms. acetivorans*, und dem Protein AhpD aus *Mycobacterium tuberculosis*. Die Proteine aus *Methanosarcina*-Arten wiesen untereinander eine hohe Sequenzidentität von 91 % und 83 % auf. Durch eine BLAST-Analyse wurde zudem eine hohe Ähnlichkeit zwischen den drei Proteinen aus *Methanosarcina*-Arten und Alkylhydroperoxidasen aus zahlreichen Bakterien festgestellt. Das Protein AhpD aus *M. tuberculosis* ist ein klassischer Vertreter der Familie der Alkylhydroperoxidasen, die primär als Disulfid-Reduktasen fungieren (87). Das Alignment der Aminosäuresequenz von AhpD und Proteinen aus methanogenen *Archaea* zeigte, dass AhpD wesentlich größer war als die anderen Proteine. Der N-terminale Bereich von AhpD enthielt einen Abschnitt, der sich bei den Proteinen aus *Ms. mazei*, *Ms. acetivorans* und *Ms. barkeri* nicht fand, und in der Mitte von AhpD war ein Abschnitt von 33 Aminosäuren vorhanden, der bei den übrigen Proteinen fehlte.

Der Vergleich von MM0631 und AhpD zeigte eine Sequenzidentität von 30 %, wobei die größte Ähnlichkeit am C-Terminus bestand, wo sich auch das aktive Zentrum von AhpD befindet. Im Abschnitt von 55 Aminosäuren um das aktive Zentrum von AhpD waren die beiden Proteine zu 36 % identisch.

Das aktive Zentrum von AhpD wird von einem CXXC-Motiv gebildet, die beiden Cysteine des Motivs waren bei allen Sequenzen konserviert (Abbildung 14). Über das CXXC-Motiv ist AhpD in der Lage, einen Dithiol-Disulfid-Austausch zwischen den Cysteinen des aktiven Zentrums und den Cysteinen eines Zielproteins zu katalysieren. Die Thiolreste der Cysteine von AhpD können Elektronen an eine Disulfidbrücke im aktiven Zentrum des Zielproteins AhpC abgeben (110). AhpC besitzt zwei Cysteine, zwischen denen nach der Reduktion von Peroxiden eine Disulfidbrücke gebildet wird. Es wurde gezeigt, dass AhpC und AhpD Komponenten einer Antwort von *M. tuberculosis* auf oxidativen Stress sind, wobei die Peroxidase AhpC nach reduktiver Eliminierung von toxischen Peroxiden durch AhpD regeneriert wird. Die katalytische Disulfidbrücke von AhpD wiederum wird durch ein System aus Liponamid und einer Liponamid-Reduktase zu einem Dithiol reduziert (110). Neben der Disulfid-Reduktase-

Aktivität ist für AhpD auch eine geringe Peroxidase-Aktivität beschrieben worden, die namensgebend für die Familie der Alkylhydroperoxidasen war.

```

MM0631      -----MTEHKEVMESIGKKMGFK--PNILETLGELDP 30
Mbar_A2454  -----MADHKTVTESIEKKMGFK--PQILETLEELDP 30
MA3736     -----MTEHEEILLESMEGKMGFT--PQVLETGLDLDP 30
AhpD       MSIEKLKAALPEYAKDIKLNLSITRSSVLDQEQWGLTLLASAAATRNQVVLADIGAEAT 60
           :  :::  :  ::  . . .  *::*  :  .

MM0631     EFLGKYRRCDGK-----LLSDGALPAKTKILM 57
Mbar_A2454  EFLSKYRRCDGK-----LLADGALPAKTKILM 57
MA3736     EFLHKYRRCDHK-----ILTDGALPSKVKILM 57
AhpD       DHLSAARHAALGAAAIMGMNNVFYRGRGFLEGRYDDLRLPGLRMNIIANPGIPKANFELW 120
           :.*  *                               ::::  .*  *

MM0631     ALAVVASKQ[ES]CTVAQMK[ES]SALNHGVTKEEIMETMEVIFITSGAPAVAACREALKLLK-- 115
Mbar_A2454  ALAVVASKQ[EA]CTVAQMK[ES]SALNHGVTKEEIMEAMEVIFITSGAPAVAACREALKLLK-- 115
MA3736     ALAVVASKQ[ES]CTVAQMK[SAL]KNGATKEEIMETMEVIFITSGAPAVAACRNALKMLKDM 117
AhpD       SFAVSAING[SH]CLVAHEHTLRTVGVDR[ES]EAI[ES]FEALKAAAIVSGVAQALATIEALS[ES]PS--- 177
           ::* * : * . * ** : : . * . : * *::: . * . * . . * :**

```

Abbildung 14: Alignment der Aminosäuresequenzen von MM0631 und verwandten Proteinen. Dargestellt sind MM0631 von *Ms. mazei*, die homologen Proteine aus *Ms. barkeri* (Mbar_A2454) und *Ms. acetivorans* (MA3736) sowie AhpD von *M. tuberculosis*. Die Cysteine des aktiven Zentrums von AhpD sind konserviert (Cys₆₇ und Cys₇₀ bei MM0631) und in dem Alignment schwarz gekennzeichnet. Sterne zeigen übereinstimmende Aminosäuren, Punkte konservative Substitutionen und Doppelpunkte semi-konservative Substitutionen. MM0631: *Ms. mazei* Gö1 (NP_632655); Mbar_A2454: *Ms. barkeri* Fusaro (YP_305950); MA3736: *Ms. acetivorans* C2A (NP_618609); AhpD: *M. tuberculosis* H37Ra (NP_216945).

3.2.3.2 Charakterisierung des rekombinanten Proteins MM0631

Das Gen *mm0631* wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pASK-IBA3 kloniert, der durch Sequenzierung auf die fehlerfreie *mm0631*-Sequenz hin überprüft wurde. Das Protein MM0631 wurde mit einem C-terminalen Strep-Tag in *E. coli* produziert und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Abbildung 15 zeigt die

Silberfärbung nach SDS-PAGE und eine Antikörperfärbung, mit einem gegen den Strep-Tag gerichteten Antikörper.

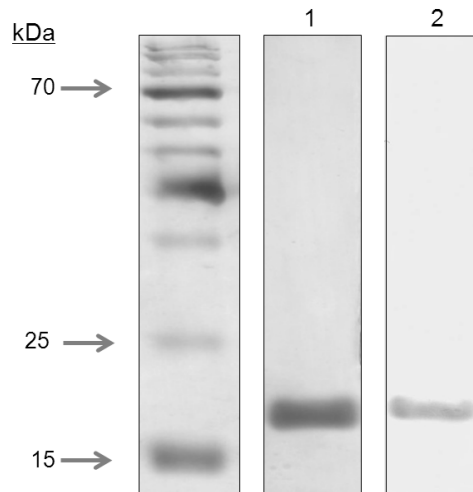


Abbildung 15: SDS-PAGE-Analyse von heterolog produziertem MM0631. (1) Silberfärbung nach SDS-PAGE (12,5 %). (2) Nachweis des Strep-Tags von MM0631 durch Antikörperfärbung. Aufgetragen wurde jeweils 2 µg Protein. Als Marker diente der vorgefärbte Proteinmarker. Von oben nach unten wiesen die Banden des Markers folgende Molekulargewichte auf: 170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa.

Das Protein konnte erfolgreich aus *E. coli*-Zellen isoliert werden. Sowohl nach aerober wie auch nach anaerober Aufreinigung hatte das isolierte Protein eine bräunliche Färbung. Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, zeigte das UV/Vis-Spektrum von MM0631 Charakteristika, die für Eisen-Schwefel-Zentren typisch sind. Das Protein absorbierte in einem breiten Bereich von 300 bis 550 nm mit Maxima bei 320, 417 und 450 nm. Das Spektrum der anaeroben Präparation war intensiver, was darauf hinwies, dass das Eisen-Schwefel Zentrum sauerstoffempfindlich war. Daher wurde für die Protein-Charakterisierung stets anaerob gereinigtes MM0631 verwendet. Abbildung 16 zeigt das Spektrum von MM0631 vor und nach einer 10-minütigen Inkubation mit Sauerstoff. Das Differenzspektrum zeigte, dass die Absorption bei 350 und 417 nm zurückging. Der Kontakt mit Sauerstoff führte aber nicht zu einem völligen Ausbleichen des Spektrums.

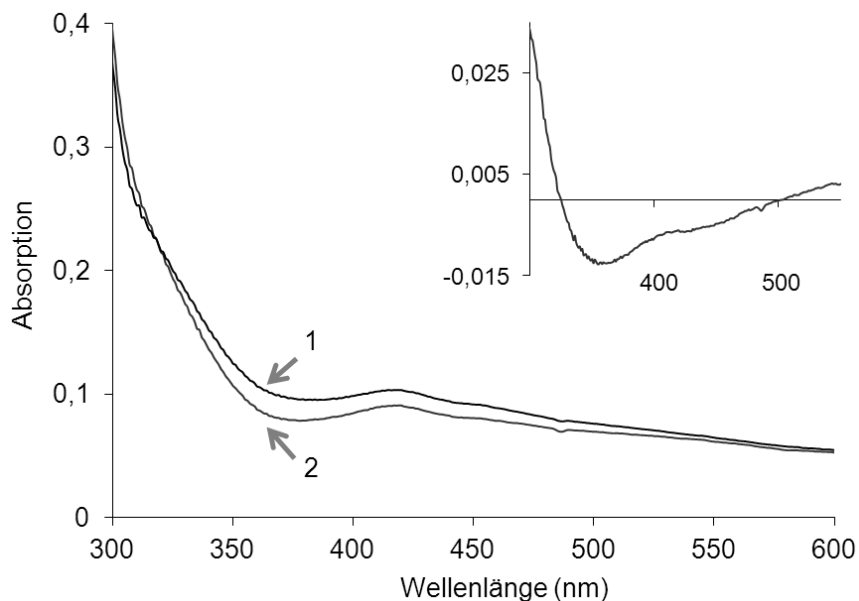


Abbildung 16: UV/Vis-Spektrum von MM0631 (2 mg ml^{-1}). (1) Spektrum des Proteins unter anaeroben Bedingungen; (2) Spektrum des Proteins nach 10 Minuten unter Sauerstoffeinfluss.

Das Protein wurde mit chemischen Methoden auf das Vorhandensein von nicht-Häm-Eisen und Säure-labilem Schwefel untersucht. Die Analyse ergab $0,2 \pm 0,02$ Schwefel pro Monomer MM0631. Eine wahrscheinliche Erklärung für den geringen Wert ist die Flüchtigkeit von Schwefelwasserstoff, der im Zuge der Nachweisreaktion entsteht. Die Untersuchung auf Eisen ergab 1,3 Eisenionen pro Monomer. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass M0631 ein Eisen-Schwefel-Cluster bindet; einen Rückschluss auf die Natur des Eisen-Schwefel-Clusters erlaubten die Ergebnisse aber nicht.

Das zu MM0631 homologe Protein MA3736 aus *Ms. acetivorans* (NP_618609) wurde in einer Arbeit von Lessner und Ferry (2007) als Disulfid-Reduktase charakterisiert (123). Die Aktivität wurde mit einem Test untersucht, der die Reduktion der Disulfidbrücke von löslichem Insulin mit DTT als Elektronendonator nachweist (91). Die Spaltung der intramolekularen Disulfidbrücke bewirkt, dass das Insulin nicht länger in Lösung bleibt. Das Ausfallen des Proteins führt zur Trübung der Suspension, die bei 650 nm photometrisch detektiert werden kann. Die Aktivität von MA3736 betrug 20 % der Aktivität von Thioredoxin aus *E. coli*, einem klassischen Vertreter der Disulfid-Reduktasen (91). In der Arbeit zu dem Enzym aus *Ms. acetivorans* werden keine Details über die Ergebnisse des Enzymtests genannt (123). Thioredoxin hat eine

Aktivität von etwa $1 - 3 \text{ U mg}^{-1}$. Ein Unit verursacht in dem Insulin-Assay bei 650 nm eine Absorptionsänderung von $1,0 \text{ min}^{-1}$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (91).

MM0631 wurde ebenfalls in einem Insulintest auf eine Disulfid-Reduktase-Aktivität untersucht. Dazu musste das Protein zunächst einer Vorbehandlung unterzogen werden. Anaerob gereinigtes MM0631 wurde mit 20 mM EDTA und etwas Reduktionsmittel inkubiert und danach mittels PD-10 Gelfiltrationssäulen entsalzt und von DTE befreit. Das so präparierte MM0631 war farblos, das Eisen-Schwefel-Cluster wurde demnach durch EDTA zerstört, und die Präparation wird fortan als apo-MM0631 bezeichnet.

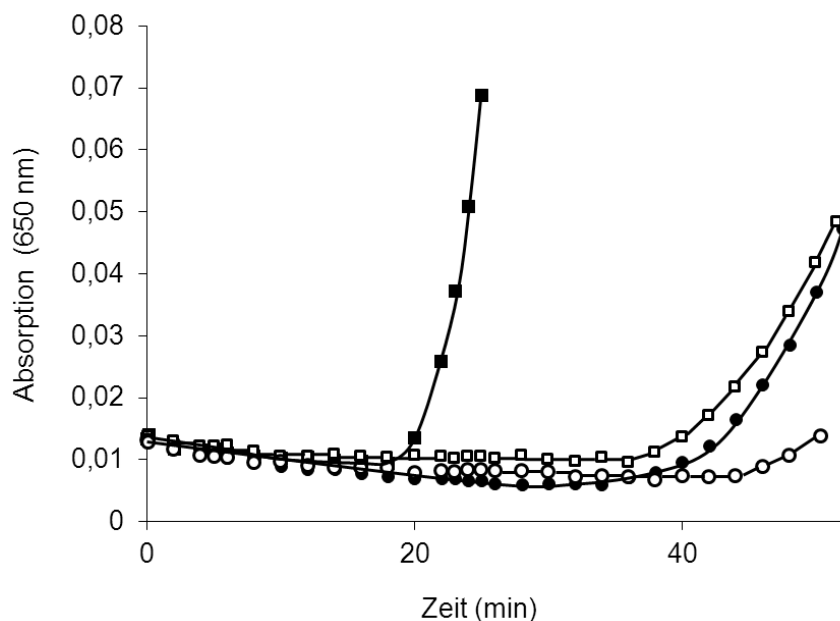


Abbildung 17: Disulfid-Reduktase-Aktivität von MM0631, detektiert in einem Insulintest mit DTE und Insulin als Substrat. Thioredoxin von *E. coli* diente als Positivkontrolle.

- 12 µM apo-MM0631; □ 24 µM apo-MM0631; ■ 4 µM Thioredoxin; ○ ohne Enzym.

Mit Hilfe des Insulintests konnte mit apo-MM0631 nur eine geringe Disulfid-Reduktase-Aktivität nachgewiesen werden. MM0631 mit Eisen-Schwefel-Cluster zeigte ebenfalls keine Aktivität. Abbildung 17 zeigt, dass DTT und Insulin, die beiden Substrate von apo-MM0631, nach einer gewissen Zeit chemisch miteinander reagierten. Nach 45 Minuten begann sich der bis dahin klare Testansatz langsam zu trüben. Eine detektierbare Disulfid-Reduktase-Aktivität muss also zu einer früher einsetzenden Trübung führen. Apo-MM0631 mit einer Konzentration von 12 und 24 µM führte in beiden Fällen zu einer Trübungsphase nach etwa 38 Minuten. Die Eigenreaktion von DTT und Insulin startete schon nach 45 Minuten, mit einer Rate von 0,0025 Absorptionsänderungen pro Minute. Als Kontrolle wurde Thioredoxin von *E. coli*

verwendet. Der Test mit 4 μM Thioredoxin führte bereits nach 20 Minuten zu einer Trübung, die eine höhere Rate aufwies als die Eigenreaktion zwischen DTT und Insulin und die Rate mit apo-MM0631.

Die Aktivität von Thioredoxin in dem Test betrug 1 U mg^{-1} , was den Literaturwerten entspricht (Angabe des Herstellers, Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Deutschland). Die Reaktion mit 4 μM Thioredoxin begann schon früher und verlief mit einer Absorptionsänderung von $0,05 \text{ min}^{-1}$ zehn Mal schneller, als mit 24 μM apo-MM0631, das eine Absorptionsänderung von $0,004 \text{ min}^{-1}$ zeigte, wobei die Konzentration an Thioredoxin nur einem Sechstel der Konzentration entsprach, die von apo-MM0631 eingesetzt wurde. Da die Funktionalität des Testsystems mit Thioredoxin überprüft wurde, war die Disulfid-Reduktase-Aktivität von apo-MM0631 dem Ergebnis nach mit diesem Test nicht nachzuweisen bzw. so gering, dass sie nicht mehr quantifizierbar war.

AhpD aus *M. tuberculosis* wird neben der primären Disulfid-Reduktase-Aktivität auch eine geringe Peroxidase-Aktivität zugeschrieben (87). Interessanterweise besitzt MM0631 neben dem CXXC-Motiv noch zwei weitere Cysteine, die nahe am N-Terminus und am C-Terminus der Aminosäurekette liegen. Bei der Peroxidase AhpC aus *M. tuberculosis* befinden sich die aktiven Cysteine ebenfalls am C- und N-Terminus. Es bestand also die Möglichkeit, dass MM0631 über die endständigen Cysteine oder das CXXC-Motiv eine Peroxidase-Aktivität ausübt. Mit MM0631 und apo-MM0631 wurden zwei verschiedene Tests durchgeführt, in denen Wasserstoffperoxid und Alkylperoxide als Substrate verwendet wurden. Elektronendonator war in einem Test DTT, in dem anderen eine kleine Elektronentransportkette mit NADPH, Glutathion-Oxidoreduktase und Glutathion, einem Tripeptid, das ebenfalls über reaktive Cysteine verfügt. In keinem der Tests konnte eine Peroxidase-Aktivität bestimmt werden, woraus gefolgert wurde, dass MM0631 keine Peroxidase ist. Da mit dem Insulintest auch keine Disulfid-Reduktase-Aktivität gefunden wurde, muss auch bezweifelt werden, dass MM0631 eine Disulfid-Reduktase ist.

3.2.4 Untersuchung des Proteins MM0632

3.2.4.1 Sequenzvergleich von MM0632

Eine Analyse der Aminosäure-Sequenz von MM0632 ergab eine hohe Ähnlichkeit mit Proteinen aus anderen Prokaryonten, die als Superoxid-Reduktasen beschrieben sind. Bislang wurden Superoxid-Reduktasen in drei Klassen eingeteilt. Als Neelaredoxin oder Typ II wird das kleinste Protein der Superoxid-Reduktasen bezeichnet, wobei das Wort „Neela“ (Sanskrit für blau) eine Anspielung auf die Farbe des Proteins ist. Neelaredoxine besitzen ein charakteristisches Eisenzentrum, das in dieser Proteinklasse erstmals beschrieben wurde (42). Das Eisenatom wird von vier Histidinen und einem Cystein ligiert, so dass das Zentrum mit der Koordination $[\text{Fe}(\text{NHis})_4(\text{SCys})]$ als Neelaredoxin-Typ bezeichnet wird. Abhängig von dem Oxidationsstatus dient eine Glutaminsäure als sechster Ligand (205).

Das $[\text{Fe}(\text{N-His})_4(\text{SCys})]$ -Zentrum findet sich bei allen Klassen der Superoxid-Reduktasen. Desulfoferrodoxine oder Typ I Superoxid-Reduktasen besitzen eine weitere, N-terminale Proteindomäne, in der ein zweites einkerniges Eisenzentrum gebunden ist. Das Eisenatom wird hier von vier Cysteinen koordiniert. Das Zentrum wurde zuerst in Rubredoxin entdeckt und wird daher im Folgenden als $[\text{Fe}(\text{SCys})_4]$ -Zentrum oder Rubredoxin-Typ bezeichnet (128). Für die Bezeichnung Desulfoferrodoxin, die nicht mit Ferredoxin verwechselt werden sollte, war zum einen die Gattung der Erstbeschreibung, *Desulfovibrio*, zum anderen das divalente Eisenion (Ferrous) namensgebend (144).

Eine Abwandlung der Desulfoferrodoxine repräsentiert die Superoxid-Reduktase von *Treponema pallidum*. Diese Superoxid-Reduktase vom Typ III entspricht dem strukturellen Aufbau eines Desulfoferrodoxins mit N-terminaler und C-terminaler Domäne, allerdings ohne $[\text{Fe}(\text{SCys})_4]$ -Zentrum. Am N-Terminus des Proteins sind keine Cysteine vorhanden (101).

Die Aminosäuresequenz von MM0632 wurde mit Superoxid-Reduktasen aus verschiedenen Organismen verglichen, um das Protein aus *Ms. mazei* in die Systematik der Superoxid-Reduktasen einzuordnen. Aus dem Vergleich mit verschiedenen Neelaredoxinen und Desulfoferrodoxinen in Abbildung 18 wird ersichtlich, dass im N-terminalen Bereich von MM0632 die vier Histidine und das Cystein, die für die Koordination des Eisenatoms im $[\text{Fe}(\text{NHis})_4(\text{SCys})]$ -Zentrum verantwortlich sind, vollständig konserviert sind. Die vier Cysteine, die bei Desulfoferrodoxinen das

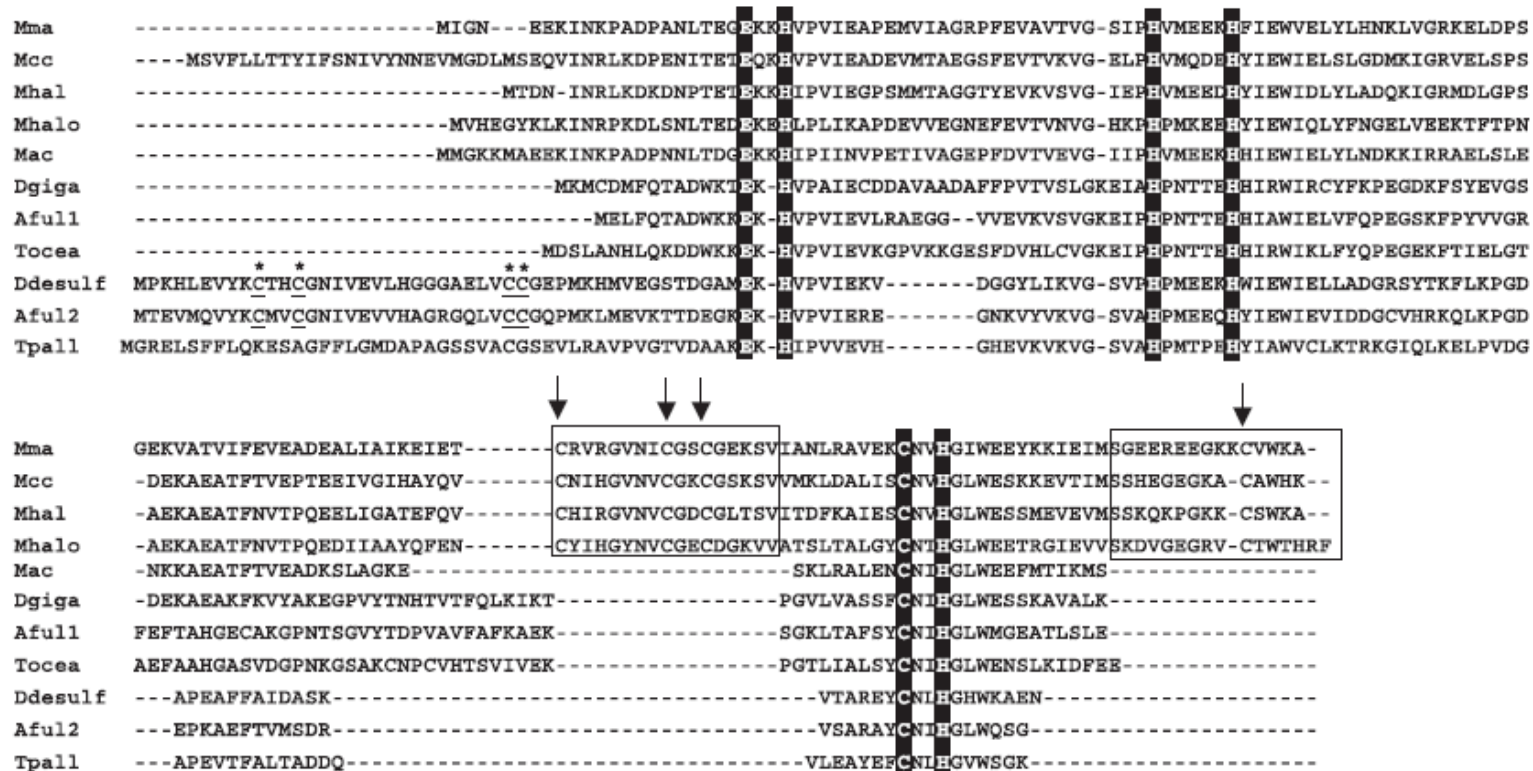


Abbildung 18: Alignment der Aminosäuresequenzen verschiedener Superoxid-Reduktasen. Die NCBI-Datenbank-Zugangsnummern lauten wie folgt: Mma: *Ms mazei*, Methanoferrodoxin, MM0632 (AAM30328); Mcc: *Methanococcoides burtonii*, Methanoferrodoxin (YP_565539); Mhal: *M. mahii*, Methanoferrodoxin (YP_003542283); Mhalo: *M. evestigatum*, Methanoferrodoxin (YP_003727000); Mac: *Ms. acetivorans*, Neelaredoxin-ähnliches Protein (NP_618610); Dgiga: *Desulfovibrio gigas*, Neelaredoxin (O50258); Aful1: *A. fulgidus*, Neelaredoxin-ähnliches Protein (O29903); Tocea: *Thermosediminibacter oceani* DSM 16646, Neelaredoxin-ähnliches Protein (YP_003826213); Ddesulf: *D. desulfuricans*, Desulfoferrodoxin (YP_002480584); Aful2: *A. fulgidus*, Desulfoferrodoxin (NP_069667); Tpa1: *T. pallidum*, SOR Typ III (ADD72914). Aminosäuren, die das [Fe(NHis)₄(SCys)]-Zentrum koordinieren, sind schwarz hervorgehoben. Cysteine, die für die Koordinierung des [Fe(SCys)₄]-Zentrums verantwortlich sind, sind mit Sternen gekennzeichnet. Die Insertionen und C-terminale Verlängerungen der Methanoferrodoxine sind durch Boxen markiert. Cysteine, die das [4Fe-4S]-Cluster koordinieren, sind durch Pfeile gekennzeichnet.

[Fe(SCys)₄]-Zentrum koordinieren, fehlen im N-terminalen Bereich von MM0632. Die Aminosäuresequenz von MM0632 ist allerdings ebenso wie die der Desulfoferrodoxine länger, als die Aminosäuresequenz der Neelaredoxine. Eine genaue Untersuchung der in der Mitte gelegenen Aminosäuresequenz von MM0632 ergab, dass hier eine Insertion stattgefunden hat. Der Bereich enthält drei Cysteine, die in einem C(X)₇CXXC-Motiv angeordnet sind. Zudem fiel bei den Alignments eine Verlängerung am C-terminalen Ende des Proteins auf, wo sich ein weiteres Cystein befindet. Neben dem Cystein für den Aufbau des [Fe(NHis)₄(SCys)]-Zentrums sind in der Aminosäuresequenz von MM0632 also vier weitere Cysteine zu finden. Cysteine sind in Metalloproteinen für die Ligation von einkernigen Eisenzentren, aber auch verschiedener Eisen-Schwefel-Cluster verantwortlich. Das Cystein-Motiv, das sich auch in mehreren Eisen-Schwefel-Proteinen findet, könnte in MM0632 für die Ligation eines Metallzentrums verantwortlich sein und damit auch die strukturellen Unterschiede zu Desulfoferrodoxinen und Neelaredoxinen erklären. Vergleicht man MM0632 mit anderen Proteinen (Abbildung 18), so fällt auf, dass sich in Verwandten von *Ms. mazei* homologe Proteine finden, die ebenfalls den Einschub mit drei Cysteinen und die C-terminale Erweiterung mit einem vierten Cystein enthalten. Homologe Bereiche dieser inserierten Abschnitte finden sich in den Proteinen von *Methanococcoides burtonii* (YP_565539), *Methanohalophilus mahii* (YP_003542283) und *Methanohalobium evastigatum* (YP_003727000) wieder, die alle zur Familie der *Methanosarcinaceae* gehören.

Das Protein wurde daher in *E. coli* produziert und mit chemischen und physikalischen Methoden auf das Vorhandensein des [Fe(N-His)₄(SCys)]-Zentrums und einer zweiten prosthetischen Gruppe untersucht.

3.2.4.2 Charakterisierung des rekombinanten Proteins MM0632

Die kodierende Region des Proteins MM0632 wurde in den Vektor pASK-IBA3 kloniert und der Vektor durch Sequenzierung überprüft. MM0632 wurde heterolog in *E. coli* als Fusionsprotein mit einem C-terminalen Strep-Tag produziert und über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Eine SDS-PAGE und die anschließende Silberfärbung bestätigte, dass das Protein in reiner Form vorlag, und eine Größe von 20 kDa aufwies, was der theoretisch berechneten Größe des Fusionsproteins von 19,2 kDa entsprach (Abbildung 19). Eine Antikörperfärbung mit einem gegen den Strep-Tag gerichteten Antikörper bestätigte zusätzlich die Identität des Proteins (Abbildung 19).

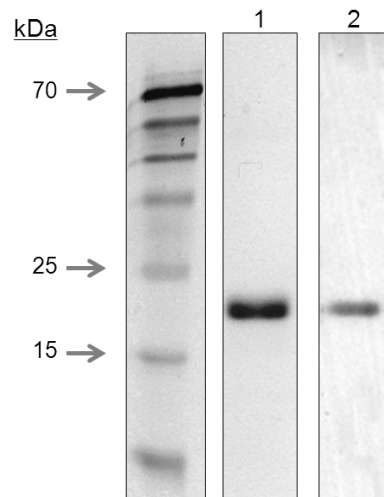


Abbildung 19: SDS-PAGE-Analyse von heterolog produziertem MM0632. (1) Silberfärbung nach SDS-PAGE (12,5 %). (2) Nachweis des Strep-Tags von MM0632 durch eine Antikörperfärbung. Aufgetragen wurde jeweils 2 µg Protein. Als Marker diente der vorgefärbte Proteinmarker. Von oben nach unten weisen die Banden des Markers folgende Molekulargewichte auf: 70 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa.

MM0632 wurde mit einer analytischen Gelfiltration weiter untersucht, um Aufschluss über den Oligomerisierungszustand des Proteins zu erlangen. Die Analyse mittels Gelfiltration ergab eine molekulare Masse von 19 kDa für das native MM0632, was einem monomeren Aufbau entsprach (Abbildung 20). Neben dem Monomer wurden noch geringe Mengen Dimere und Trimere gefunden, die weniger als 10 % des gesamten Proteins ausmachten (Abbildung 20).

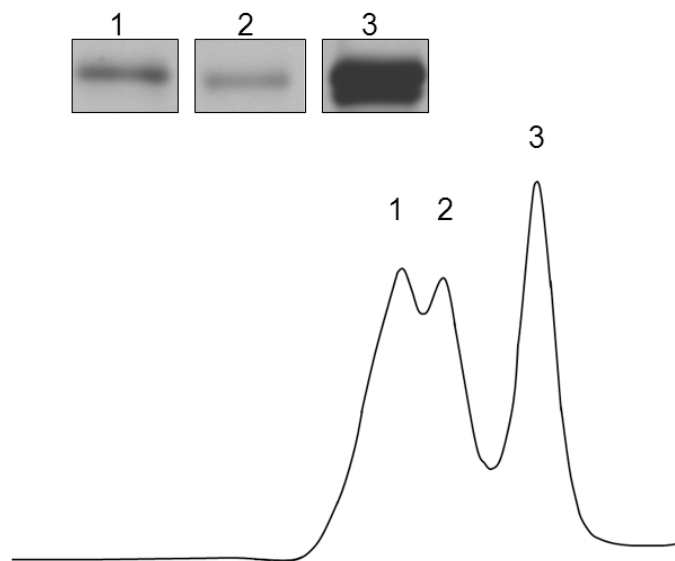


Abbildung 20: Chromatogramm der Gelfiltration von MM0632. Aufgezeichnet wurde der Proteingehalt bei 280 nm. (1) Trimer, (2) Dimer, (3) Monomer. Über dem Chromatogramm ist die Silberfärbung der Proben nach SDS-PAGE (12,5 %) gezeigt.

Nach der Produktion des Proteins MM0632 unter anaeroben Bedingungen und Reduktion durch Wasserstoffperoxid, zeigte die spektrale Untersuchung eine breite Absorption im Bereich von 420 bis 550 nm mit einem Maximum bei 470 nm (Abbildung 21 A). Nach der Zugabe von Natriumdithionit oder Ascorbat in geringem Überschuss verschwand diese Absorption vollständig (Abbildung 21 A). Die Absorption wurde dem $[\text{Fe}(\text{NHis})_4(\text{SCys})]$ -Zentrum zugeschrieben und ist der Absorption mancher Neelaredoxine und Desulfoferrodoxine ähnlich, wobei Neelaredoxine zwischen 600 und 700 nm mit einem Maximum bei 650 nm absorbieren, und nicht zwischen 420 und 550 nm wie MM0632 (42). Eventuell liegt dieser Unterschied in dem unterschiedlichen Aufbau der Proteine begründet (Kapitel 3.2.4.1). Das UV/Vis-Spektrum des anaerob gereinigten MM0632 hatte keine spektralen Charakteristika von Eisen-Schwefel-Proteinen, die typischerweise Absorptionsmaxima bei 320 und 420 – 450 nm zeigen (80).

Es ist bekannt, dass Eisen-Schwefel-Proteine, die in *E. coli* heterolog produziert werden, oft ungenügend mit der prosthetischen Gruppe versehen werden. In der Literatur sind zahlreiche Studien zu finden, in denen die Eisen-Schwefel-Cluster solcher Proteine durch die Inkubation mit Eisenionen und Sulfid *in vitro* erfolgreich

rekonstituiert werden konnten (84, 194, 207). Da MM0632 auch aus *E. coli* gereinigt wurde, lag der Versuch nahe, durch eine Rekonstitution die Fähigkeit des Proteins zu untersuchen, ein Eisen-Schwefel-Cluster zu binden. Daher wurde anaerob produziertes Protein mit FeCl_3 und Na_2S im Rohextrakt unter reduktiven Bedingungen inkubiert, um auf diese Weise die Rekonstitution von Eisen-Schwefel-Zentren zu erreichen (Kapitel 2.5.7.1). Das rekonstituierte Protein eluierte in dem darauf folgenden ersten Reinigungsschritt mit einer braunen Farbe von der Affinitätssäule.

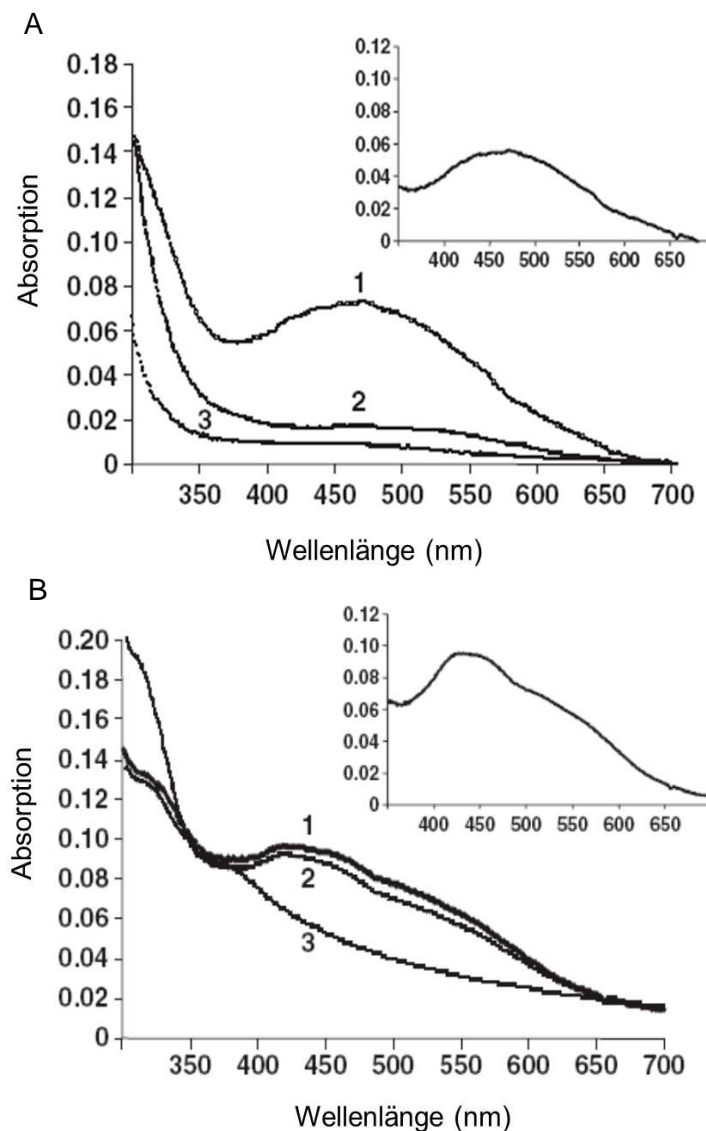


Abbildung 21: UV/Vis-Spektrum von MM0632. (A) nicht-rekonstituiertes Protein (0,2 mg ml⁻¹): (1) H₂O₂-oxidiert; (2) Natriumdithionit-reduziert; (3) Ascorbat-reduziert. Der Einschub zeigt das Differenzspektrum im oxidierten minus reduzierten Zustand. (B) Rekonstituiertes Protein (0,1 mg ml⁻¹): (1) H₂O₂-oxidiert; (2) Ascorbat-reduziert; (3) Natriumdithionit-reduziert;. Der Einschub zeigt das Differenzspektrum im oxidierten minus reduzierten Zustand.

Die braune Farbe behielt das Protein auch nach einem zweiten Reinigungsschritt mittels Zentricon-Zentrifugationsröhrchen (Kapitel 2.5.6). Nach Oxidation mit H_2O_2 zeigte das Spektrum des gereinigten Proteins eine erhöhte Absorption im Bereich von 400 bis 600 nm mit einem breiten Peak um ein Maximum bei 420 nm und einer Schulter bei 470 nm (Abbildung 21 B). Diese Absorption verschwand nach Reduktion des Proteins mit Natriumdithionit (Abbildung 21 B). Dies deutet darauf hin, dass das $[\text{Fe}(\text{NHis})_4(\text{SCys})]$ -Zentrum und das rekonstituierte Eisen-Schwefel-Cluster reduziert wurden. Die Reduktion mit Natriumascorbat resultierte nur in einer geringen Reduktion der Absorption im Bereich bei 400 und 600 nm. Dies ist der Bereich der Absorption, der auch schon bei dem nicht-rekonstituierten Protein nach Behandlung mit Ascorbat ausbleich und lässt sich auf die Reduktion des $[\text{Fe}(\text{NHis})_4(\text{SCys})]$ -Zentrum von MM0632 zurückführen. Ascorbat ist ein weniger starkes Reduktionsmittel als Natriumdithionit und führt wahrscheinlich zu einer teilweisen Reduktion des $[\text{Fe}(\text{NHis})_4(\text{SCys})]$ -Zentrums, das bei Neelaredoxinen und Desulforedoxinen ein hohes Redox-Potential von $\sim +200$ mV aufweist (101, 168, 190). Das Eisen-Schwefel-Cluster von MM0632 hat vermutlich ein negativeres Redoxpotential und wird durch Ascorbat nicht reduziert. Protein MM0632 zeigte große Ähnlichkeiten zu Superoxid-Reduktasen (Kapitel 3.2.4.1), daher wurde untersucht ob Superoxid einen Einfluss auf das Spektrum ausübt. Kaliumsuperoxid wurde in DMSO gelöst und in geringen Mengen einer rekonstituierten Präparation von MM0632 zugegeben (127). Die Absorption von MM0632 blieb in diesem Experiment unverändert.

Um auszuschließen, dass Eisen unspezifisch an das Protein gebunden war, wurde die Rekonstitution von MM0632 nur mit FeCl_3 und Reduktionsmittel, ohne Na_2S , durchgeführt. Das Spektrum des so rekonstituierten Proteins entsprach, nach der Aufreinigung und nach einer Waschprozedur durch Zentrifugation, dem nicht-rekonstituierten Protein. Daraus kann geschlossen werden, dass die zusätzlichen Cysteine ein Eisen-Schwefel-Cluster koordinieren.

Das rekonstituierte Protein wurde chemisch auf das Vorhandensein von Nicht-Häm-Eisen und Säure-labilem Schwefel untersucht. Um möglicherweise unspezifisch gebundenes Eisen und Schwefel zu entfernen, wurde das Protein entsalzt und über Nacht unter anaeroben Bedingungen dialysiert. Für das so präparierte Protein konnten durch Schwefelbestimmung $4,5 \pm 1,2$ mol Schwefel per mol Protein bestimmt werden. Die Eisenbestimmung lieferte einen Gehalt von $5,7 \pm 0,4$ mol Eisen pro mol Protein. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein $[\text{4Fe-4S}]$ -Cluster in dem Protein gebunden ist. Dieses $[\text{4Fe-4S}]$ -Cluster kann nur durch die in den Insertionsbereichen von MM0632 befindlichen Cysteine koordiniert werden.

Um die Präsenz des [4Fe-4S]-Cluster in dem rekonstituierten Protein zu bestätigen, wurde das Protein in Zusammenarbeit mit Prof. Friedrich und Katerina Dörner (Institut für organische Chemie und Biochemie, Freiburg) mittels ESR-Spektroskopie analysiert. ESR-Spektren des isolierten und des mit Natriumdithionit reduzierten Enzyms wurden aufgenommen. Das bei 13 K aufgenommene Spektrum der reduzierten Probe zeigte ein axiales Signal mit $g_{x,y} = 1,93$ und $g_z = 2,047$ (Abbildung 22 B). Die Intensität des Signals nahm mit steigender Temperatur ab und war in den Spektren der oxidierten Probe nicht vorhanden (Daten nicht gezeigt). Das Signal wurde einem vierkernigen *high-spin* [FeS]-Zentrum zugeordnet. Es war bei $g = 2,03$ von einem zweiten Signal unbekannter Herkunft überlagert. Abbildung 22 (A) zeigt das Differenzspektrum aus einem bei 6 K aufgenommenen Spektrum des isolierten, im oxidierten Zustand vorliegenden Proteins und aus einem Spektrum der reduzierten Probe. Es zeigt ein typisches Signal eines *high-spin* ($S = 5/2$) Fe^{3+} -Zentrums bei $g = 4,3$. Das Signal wurde dem $[Fe(N-His)_4(SCys)]$ -Zentrum zugeordnet und auch bei Neelaredoxinen, beispielsweise von *Desulfovibrio vulgaris* und *Pyrococcus furiosus*, und in dem Desulfoferrodoxin von *Desulfovibrio desulfuricans* beschrieben (44, 45, 190). In Verbindung mit der Bestimmung des Eisen- und Schwefelgehalts des rekonstituierten Enzyms MM0632 wurde ein $[Fe(His)_4(Cys)]$ -Zentrum und ein [4Fe-4S]-Zentrum als

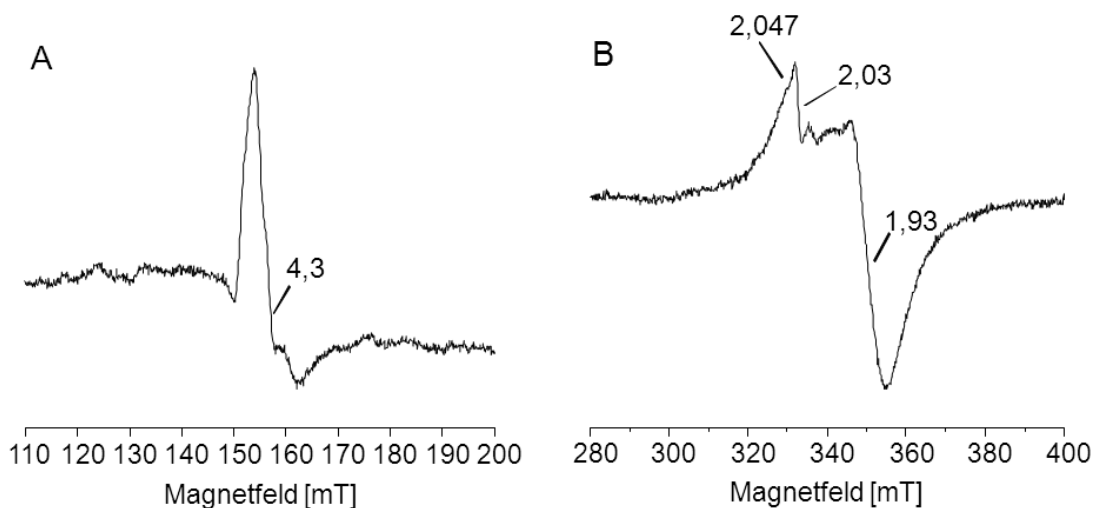


Abbildung 22: ESR-Spektrum von MM0632. (A): Differenzspektrum des Enzyms im Zustand nach der Isolation und im reduzierten Zustand (wenige Körnchen Natriumdithionit). Akkumulation von fünf Aufnahmen bei 6 K. (B): Spektrum der Natriumdithionit-reduzierten Präparation. Die Spektren wurden bei 13 K und 10 mW mit einer Modulationsamplitude von 0,6 mT aufgenommen. Weitere ESR-Bedingungen: Mikrowellen-Frequenz: 9,46 GHz, Zeitkonstante: 0,164 sek, Aufnahmezeit: 17,9 mT min⁻¹. Die eingezeichneten Zahlen entsprechen den g-Werten.

prosthetische Gruppen in MM0632 nachgewiesen. Ein zusätzliches Signal unbekannter Herkunft wurde detektiert und stammt möglicherweise von einem low-spin $S = \frac{1}{2} \text{Fe}^{3+}$, vermutlich lokalisiert im $[\text{Fe}(\text{His})_4(\text{Cys})]$ -Zentrum.

3.2.4.3 Superoxid-Reduktase-Aktivität von MM0632

Die strukturelle Ähnlichkeit von MM0632 zu Superoxid-Reduktasen ist oben bereits beschrieben worden. Nun sollte MM0632 in einem Enzymtest mit Cytochrom *c* auf die Superoxid-Reduktase-Aktivität hin untersucht werden (135, 137). Der Cytochrom *c*-Test nutzt die Fähigkeit von Superoxid, Cytochrom *c* zu reduzieren. Außerdem macht er sich die Fähigkeit von Superoxid-Reduktasen zunutze, reduziertes Cytochrom *c* als artifiziellen Elektronendonator zu verwenden (Abbildung 23). Der Test besteht aus zwei Phasen. Superoxid wird kontinuierlich durch die Xanthin-Oxidase generiert und reduziert in der ersten Phase Cytochrom *c*. Superoxid-Reduktasen haben eine Cytochrom *c*-Oxidase und eine Superoxid-Reduktase-Funktion. So bewirkt in der zweiten Phase die Zugabe der Superoxid-Reduktase, dass Cytochrom *c* oxidiert wird, und Superoxid zu Peroxid reduziert wird (Abbildung 23). Die Reduktion und Oxidation von Cytochrom *c* kann photometrisch anhand der Absorption bei 550 nm verfolgt werden. Das entstehende Peroxid wird durch eine Katalase eliminiert.

Die erste Versuchsphase in Abbildung 23 zeigt die Reduktion von Cytochrom *c* durch Superoxid nach Zugabe der Xanthin-Oxidase. Die Rate wurde auf einen Wert von $0,025 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$ eingestellt, was in etwa einer Aktivität von 1 U ml^{-1} entspricht (127). Nach jeweils 75 Sekunden wurden verschiedene Mengen rekonstituiertes MM0632 zugegeben. Hierdurch verringerte sich die Rate der Cytochrom *c*-Reduktion, wobei der Rückgang von der Menge des zugegebenen MM0632 abhängig war. Hohe Konzentration von MM0632 führten dazu, dass nicht nur die Reduktion des Cytochroms verlangsamt wurde, sondern die Menge des reduzierten Cytochrom *c* abnahm, da die Aktivität des Enzyms die Reduktionsrate des Cytochroms durch O_2^{2-} überstieg. Dieser Effekt wird durch die Abnahme der Absorption bei 550 nm deutlich. Unter den hier gewählten Test-Bedingungen führte die Zugabe von ca. 130 ng ml^{-1} MM0632 zu einer Oxidation von Cytochrom *c*, 470 ng ml^{-1} MM0632 waren in der Lage, Cytochrom *c* schnell zu oxidieren (Abbildung 23). Dies zeigte eindeutig, dass MM0632 eine Superoxid-Reduktase-Aktivität besaß, also eine für diese Enzymklasse typische Aktivität mit Cytochrom *c* als Elektronendonator und Superoxid als Elektronenakzeptor. Der Cytochrom *c*-Test demonstrierte zudem, dass MM0632 keine Superoxid-Dismutase ist, da diese Enzyme keine Cytochrom *c*-Oxidation katalysieren.

In einem Kontrollexperiment wurde 40 U ml^{-1} einer Superoxid-Dismutase aus dem Rind zusammen mit MM0632 in dem Testsystem mit Cytochrom *c* eingesetzt. Der Vergleich

mit dem Ansatz ohne Superoxid-Dismutase zeigte, dass die Aktivität von MM0632 stark verlangsamt war. Die Hemmung wurde durch die Konkurrenz der Superoxid-Dismutase und Superoxid-Reduktase um das Superoxid hervorgerufen.

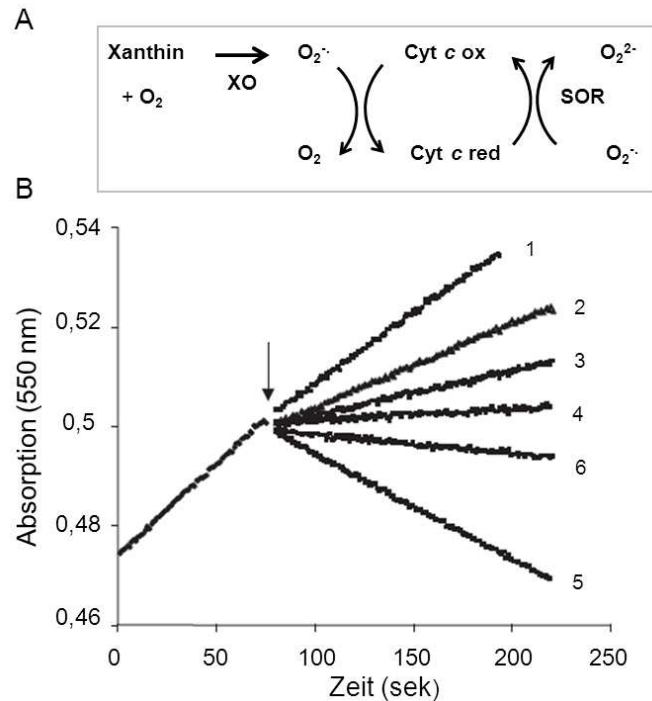


Abbildung 23: Superoxid-Reduktase-Aktivität von MM0632. (A) Katalytischer Zyklus des Enzymtests: Cytochrom c (Cyt c) wird durch Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) reduziert, das mittels Xanthin und Xanthin-Oxidase (XO) generiert wird. Eine Superoxid-Reduktase (SOR) oxidiert Cytochrom c und reduziert Superoxid zu Peroxid (O_2^{2-}). (B) Enzymtest mit MM0632; der Pfeil kennzeichnet die Zugaben von MM0632, die in unterschiedlichen Konzentrationen jeweils zu einer Verlangsamung der Reduktion von Cytochrom c und bei hohen Konzentrationen zur Oxidation führten: (1) 31 ng ml^{-1} , (2) 62 ng ml^{-1} , (3) 93 ng ml^{-1} , (4) 124 ng ml^{-1} , (5) 470 ng ml^{-1} , (6) 470 ng ml^{-1} plus Superoxid-Dismutase (40 U ml^{-1}).

Die Enzymaktivität von rekonstituiertem MM0632 wurde anhand der für Superoxid-Dismutasen vorgeschlagenen Definition berechnet. Demnach ist eine Einheit (U) Superoxid-Reduktase-Aktivität definiert durch die Proteinmenge, die nötig ist, um die Cytochrom c Reduktion um 50 % zu verringern (135). Eine Proteinmenge von 0 bis 100 ng wurde für die Berechnung der Aktivität verwendet. In dem Cytochrom c-Test führte die Zugabe von $72 \pm 9 \text{ ng}$ MM0632 zu einer 50 %igen Inhibierung, was einer Aktivität von 1 U nach oben genannter Definition entspricht. Aus diesem Wert ließ sich eine spezifische Aktivität von $13900 \pm 1700 \text{ U mg}^{-1}$ für das rekonstituierte Protein MM0632 errechnen.

Das nicht-rekonstituierte MM0632 wies eine Aktivität von $13900 \pm 2500 \text{ U mg}^{-1}$ auf, was sich mit der Aktivität des rekonstituierten Enzyms mit [4Fe-4S]-Cluster deckte. Dieses Ergebnis zeigte, dass das [4Fe-4S]-Cluster nicht an der Reaktion beteiligt und alleine das $[\text{Fe}(\text{NHis})_4(\text{SCys})]$ -Zentrum für die Superoxid-Reduktase-Aktivität verantwortlich ist.

Der Cytochrom *c*-Test wurde stets aerob durchgeführt, da die Reaktion der Xanthin-Oxidase Sauerstoff benötigt. Um zu überprüfen, ob MM0632 Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwenden kann, wurde in einem Kontrollexperiment das Cytochrom *c* chemisch mit Natriumdithionit reduziert, bis etwa zwei Drittel des Proteins im reduzierten Zustand vorlagen. MM0632 war nicht in der Lage, das Cytochrom *c* mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor zu oxidieren (nicht gezeigt).

In früheren Arbeiten mit Superoxid-Reduktasen wurde gefunden, dass modifiziertes Cytochrom *c*, dessen Lysinseitenketten zu etwa 60 % acetyliert sind, nicht als Elektronendonator verwendet wird (100). Acetyliertes Cytochrom *c* ist durch Superoxid und andere Reduktionsmittel wie Dithionit reduzierbar, die Reaktion mit Oxidasen ist jedoch erschwert. Die Fähigkeit der Cytochrom *c*-Oxidasen aus Mitochondrien mit partiell acetyliertem Cytochrom *c* zu reagieren, war in einer Studie von Azzi *et al.* (1975) um 95 % verringert (12). Interessanterweise konnte dies für MM0632 nicht bestätigt werden. MM0632 zeigte keine verlangsamte Aktivität, wenn acetyliertes Cytochrom *c* verwendet wurde.

Klassische Superoxid-Dismutasen haben eine Aktivität von etwa 2000 U mg^{-1} . Auch für Superoxid-Reduktasen ist eine Superoxid-Dismutase-Aktivität nachgewiesen worden, die jedoch um eine ganze Größenordnung geringer ist. Wahrscheinlich handelt es sich um eine Nebenaktivität, denn kinetische Messungen konnten nachweisen, dass die Superoxid-Dismutase-Aktivität von Superoxid-Reduktasen nicht höher ist als die Rate der spontanen Disproportionierung von Superoxid (48). Bei den Neelaredoxinen von *Clostridium acetobutylicum* und *Pyrococcus furiosus* wurde eine Aktivität von 25 U mg^{-1} bzw. 160 U mg^{-1} gemessen (82, 100, 163), bei Desulfoferrodoxin von *D. vulgaris* fand man eine Aktivität von 20 U mg^{-1} (144). Der Standardtest nutzt den Farbstoff Nitrotetrazoliumblau, der durch Superoxid, ähnlich dem Cytochrom *c*-Test, reduziert wird (14). Diese Reduktion wird durch Superoxid-Dismutasen, die Superoxid eliminieren, verlangsamt. In dieser Arbeit wurde für MM0632 nur eine geringe Superoxid-Dismutase-Aktivität von 25 U mg^{-1} festgestellt.

In dem vorangehenden Abschnitt wurde die Superoxid-Reduktase-Aktivität von MM0632 mit Hilfe des Cytochrom *c*-Tests nachgewiesen. Anstelle des Cytochrom *c* wurde in einem zweiten Aktivitätstest Rubredoxin als Elektronendonator für MM0632 verwendet. Rubredoxin ist ein kleines Protein mit einem einkernigen $[\text{Fe}(\text{SCys})_4]$ -

Zentrum. Schon früh wurde angenommen, dass Rubredoxin als Elektronendonator für Superoxid-Reduktasen fungieren kann, da die Gene der Superoxid-Reduktase, des Rubredoxins und einer Oxidoreduktase in zahlreichen Organismen in einem Gencluster liegen (82). In den Organismen *D. vulgaris* und *Clostridium thermoaceticum* wurde nachgewiesen, dass das Gen der Superoxid-Reduktase mit einem Gen für ein Rubredoxin co-transkribiert wird (34, 53). Rubredoxin wird in Clostridien durch eine NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase reduziert, die Elektronen aus dem NADH-Pool der Zelle bezieht. In dieser Arbeit wurde Rubredoxin (NP_349382) von *C. acetobutylicum*, und das Enzym Ferredoxin:NADP⁺-Oxidoreduktase aus *Spinacia oleracea* in einem Enzymtest mit MM0632 eingesetzt (163, 164). Abbildung 24 zeigt die Superoxid-Reduktase-Aktivität von MM0632 mit Xanthin und Xanthin-Oxidase als Superoxid-Quelle. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Rubredoxin gestartet; keine Reaktion außer der Hintergrundaktivität war zu beobachten, wenn eine der Komponenten weggelassen wurde. Als Kontrolle wurde die Superoxid-Dismutase hinzugezogen. Die Superoxid-Dismutase konnte MM0632 nicht ersetzen, da sie keine Superoxid-Reduktase-Aktivität besitzt. Wurden MM0632 und die Superoxid-Dismutase gemeinsam in einem Test eingesetzt, verringerte sich die NADH-Oxidase-Aktivität. Dies zeigte, dass Superoxid der terminale Akzeptor für MM0632 war. Das Experiment zeigte, dass Rubredoxin aus dem grampositiven Bakterium *C. acetobutylicum* als Elektronendonator für MM0632 aus *Ms. mazei* fungieren kann.

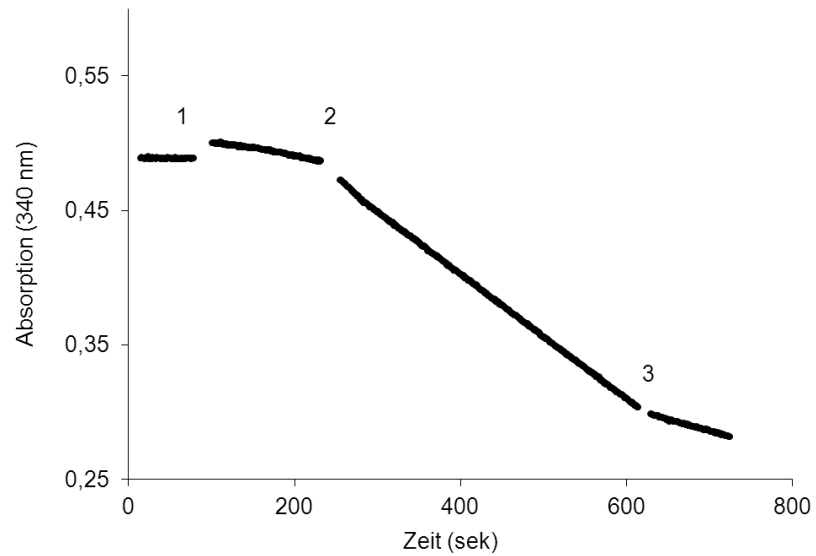


Abbildung 24: Superoxid-Reduktase-Aktivität von MM0632 mit Rubredoxin aus *C. acetobutylicum* als Elektronen-Donor. Die Reaktion wurde photometrisch anhand der Absorption von NADPH bei 340 nm verfolgt. Zu Beginn enthielt die Reaktion 250 μM NADPH, 0,06 μM Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase, 0,2 mM Xanthin, 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Xanthin-Oxidase und 500 U ml^{-1} Katalase. Zugegeben wurden: (1) 2 μM MM0632; (2) 6 μM Rubredoxin; (3) 60 U ml^{-1} Superoxid-Dismutase.

Zusammengefasst zeigten die chemischen und spektralen Untersuchungen mit rekonstituiertem MM0632 klar, dass das Protein ein $[\text{Fe}(\text{NHis})_4(\text{SCys})]$ -Zentrum bindet, und zusätzlich über ein $[\text{4Fe-4S}]$ -Cluster verfügt. Die Superoxid-Reduktase-Aktivität von MM0632 konnte in verschiedenen Test-Systemen nachgewiesen werden. MM0632 ist demnach die erste beschriebene Superoxid-Reduktase mit einem Eisen-Schwefel-Cluster und bildet daher neben den bekannten Superoxidreduktasen eine neue Proteinklasse (Klasse VI), die, in Analogie zu der Bezeichnung Desulfoferrodoxin (Klasse I), als Methanoferrodoxin bezeichnet wurde. Neelaredoxine bilden die Klasse II, das Protein aus *T. pallidum* die Klasse III.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in dem Genom von *Ms. mazei* ein weiteres offenes Leseraster identifiziert, das noch vor der kodierenden Region von MM0629 lag und für ein Desulforedoxin (MMDx) kodiert (Kapitel 3.2.2). Desulforedoxine sind den Rubredoxinen sehr ähnlich. Sie besitzen ebenfalls ein einkerniges $[\text{Fe}(\text{SCys})_4]$ -Zentrum, haben jedoch eine geringere molekulare Masse und das Eisen-Zentrum zeigt abweichende spektrale Charakteristika (18).

Desulforedoxin aus *Ms. mazei* wurde in einem Test eingesetzt, der dem oben beschriebenen Test mit Rubredoxin ähnelte (Abbildung 25). Hier sollte überprüft werden, ob das methanogene Desulforedoxin als Elektronendonator für die Superoxid-Reduktase aus *Ms. mazei* fungiert. Die Elektronentransportkette wurde mit der NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase (NP_349062) aus *C. acetobutylicum* komplementiert, die Elektronen von NADH auf Desulforedoxin überträgt. Als Elektronenakzeptor für MM0632 diente Superoxid, erzeugt durch Xanthin und Xanthin-Oxidase. In Abbildung 25 (A) ist die NADH-Oxidase-Aktivität des Testsystems zu erkennen, die mit der Zugabe von Desulforedoxin zu den übrigen Komponenten gestartet wurde. Um die volle Aktivität des komplementierten Ansatzes zu erreichen, waren alle Komponenten, die NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase, Desulforedoxin, MM0632 und die Xanthin-Oxidase, notwendig. Es fand kein NADH-Verbrauch statt, der über die Hintergrundaktivität hinausging, wenn eine der Proteinkomponenten fehlte. Abbildung 25 (B) zeigt die Abhängigkeit der Superoxid-Reduktase-Aktivität von der Konzentration des Desulforedoxins, bei der Verwendung von rekonstituiertem und nicht-rekonstituiertem MM0632. Wie erwartet nahm die Aktivität in beiden Fällen mit steigender Konzentration des Desulforedoxins zu und erreichte bei hohen Konzentrationen eine Sättigung. Die rekonstituierten und nicht-rekonstituierten Proteinproben zeigen vergleichbare Aktivitäten, wodurch gezeigt wurde, dass das $[\text{4Fe-4S}]$ -Cluster für die Interaktion mit Desulforedoxin nicht essentiell ist.

Die Experimente mit Desulforedoxin verdeutlichen, dass Desulforedoxin aus *Ms. mazei* der Elektronendonator für MM0632 ist. Dies ist der erste Nachweis einer physiologischen Interaktion der in dieser Arbeit untersuchten Proteine.

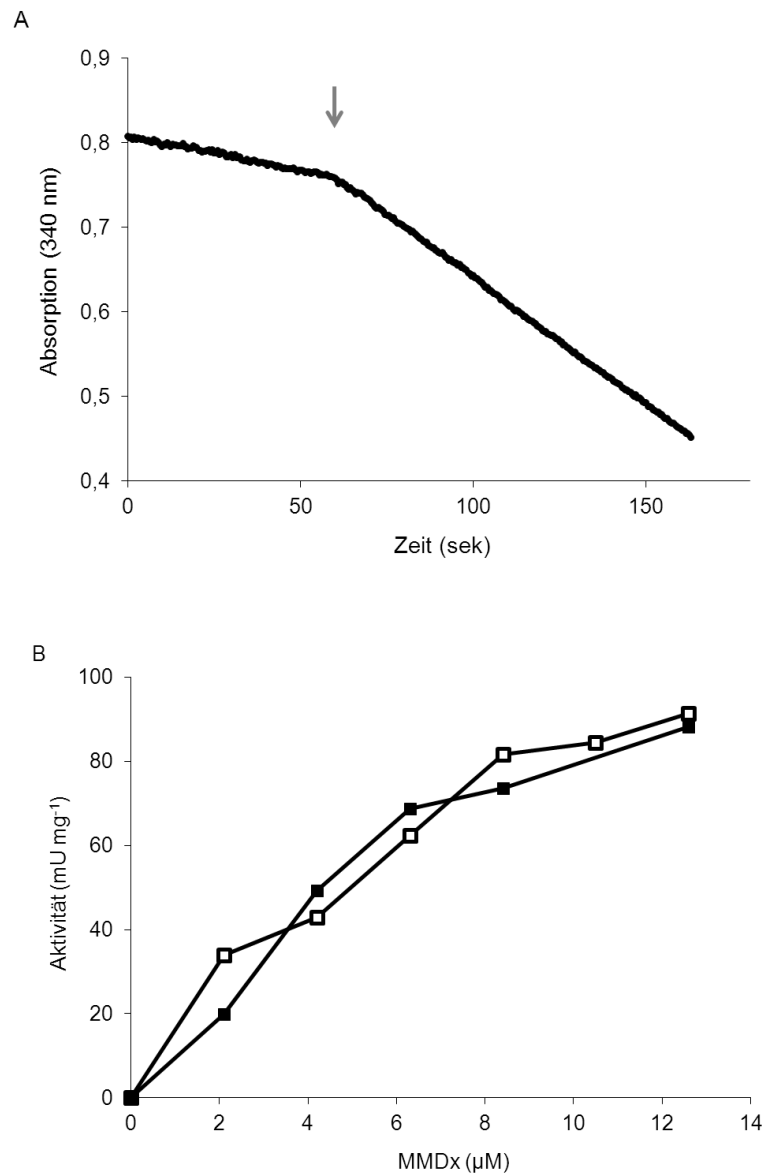


Abbildung 25: Superoxid-Reduktase-Aktivität mit Desulforedoxin von *Ms. mazei* als Elektronendonator. (A) Desulforedoxin-abhängige Reduktion von MM0632. Zu Beginn enthielt die Reaktion 250 μM NADH, 8 μg ml⁻¹ NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase, 4 μM 0632, 0,2 mM Xanthin, 7 μg ml⁻¹ Xanthin-Oxidase und 250 U ml⁻¹ Katalase. Der Pfeil kennzeichnet die Zugabe von 1,5 μM Desulforedoxin. (B) Abhängigkeit der Aktivität von der Desulforedoxin-Konzentration bei gleichbleibender Menge der übrigen Komponenten 0,05 μM NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase, 2 μM MM0632, 0,2 mM Xanthin und 7 μg ml⁻¹ Xanthin-Oxidase und 500 U ml⁻¹ Katalase. Gezeigt ist die Aktivität für rekonstituiertes und nicht-rekonstituiertes MM0632: ■ rekonstituiertes MM0632, □ nicht-rekonstituiertes MM0632.

3.2.4.4 Nachweis von Wasserstoffperoxid

Superoxid-Reduktasen reduzieren Superoxid zu Wasserstoffperoxid, das in der Zelle durch Katalasen oder Peroxidasen entgiftet wird. In dem *in vitro* Test wurde Wasserstoffperoxid mit einer Meerrettich-Peroxidase nachgewiesen, die mit Wasserstoffperoxid und dem Fluorochrom Amplex-Red reagiert (Abbildung 26). Das hieraus entstehende Resorufin wurde photometrisch bei 560 nm nachgewiesen (174).

Der Test enthielt zu Beginn die Komponenten der Elektronentransportkette, NADPH, Ferredoxin:NADP⁺-Oxidoreduktase und Rubredoxin, sowie die Xanthin-Oxidase. Die Anfangssteigung wurde durch Wasserstoffperoxid hervorgerufen, das durch die Aktivität der Xanthin-Oxidase und durch die Disproportionierung von Superoxid gebildet wurde. Die Zugabe von MM0632 resultierte in einer Steigerung der Aktivität, wodurch Wasserstoffperoxid als Produkt der Superoxid-Reduktase-Reaktion von MM0632 nachgewiesen wurde.

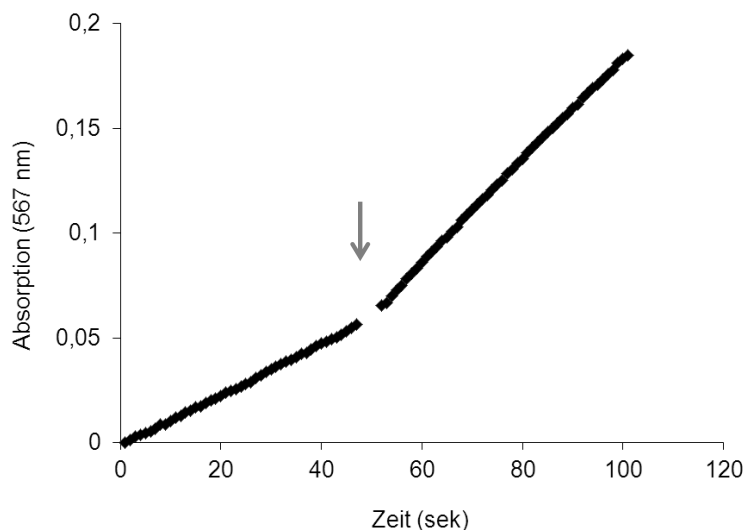


Abbildung 26: Nachweis von Wasserstoffperoxid als Produkt der Superoxid-Reduktase-Aktivität von MM0632. Wasserstoffperoxid wurde durch die Meerrettich-Peroxidase nachgewiesen, die Wasserstoffperoxid und einen Farbstoff als Substrate verwendet. Der Pfeil kennzeichnet die Zugabe von MM0632 zu den übrigen Komponenten des Tests.

3.2.4.5 Regulation des Operons *mmdx* – *mm0636* nach Sauerstoffschock

MM0632 wurde in dieser Arbeit als Superoxid-Reduktase charakterisiert. Diese Funktion macht eine Beteiligung des Enzyms an der zellulären Antwort auf Sauerstoff-Stress wahrscheinlich. Information über die Funktion von Proteinen kann neben einer

Untersuchung der Proteine selbst auch das Transkriptionsprofil der entsprechenden Gene liefern. In diesem Experiment wurde die Transkription des Operons *mmdx – mm0636* in *Ms. mazei* nach einem Sauerstoffschock in der Annahme untersucht, dass das Operon vermehrt exprimiert wird, wenn die Zellen mit Sauerstoff in Berührung kommen. Eine auf TMA gewachsene Kultur wurde in der exponentiellen Phase für fünf Minuten mit künstlicher Luft (80% N₂/ 20% O₂) durchgast. Die präparierten mRNAs der mit Luft behandelten Kultur und einer Kontrollkultur wurden in einem qRT-PCR-Experiment mit Primern für *mm0632* und *mm0636* untersucht. Als Kontrolle wurden auch die relative mRNA-Mengen weiterer Gene bestimmt, die an der Sauerstoffentgiftung beteiligt sind: Es handelte sich um die Transkripte der Superoxid-Dismutase (*mm2423*) und der beiden Katalasen (*mm1959*, *mm2557*) von *Ms. mazei*. Als Referenzwert für die Quantifizierung wurde der relative mRNA-Gehalt der Gene *gap* und *Isu* quantifiziert, die konstitutiv in *Ms. mazei* exprimiert werden (93). Der Vergleich der Δ Ct-Werte der ausgewählten Gene einer Wildtyp-Kultur mit einer Sauerstoff-geschockten Kultur zeigte, dass weder die Gene des Operons *mmdx-mm0636*, noch die Gene der Superoxid-Dismutase und der Katalasen von *Ms. mazei* verstärkt exprimiert werden, wenn die Zellen Sauerstoffstress ausgesetzt werden (Abbildung 27). Die Transkriptmengen der Gene *mm0632* und *mm0636* waren vergleichbar mit der des Zentralgens *gap*. Die relative RNA-Menge des zweiten Zentralgens, *Isu*, war etwa drei Mal höher als die relative RNA-Menge von *gap*. Die Transkriptmengen der Gene der Superoxid-Dismutase und der Katalase (*mm1959*) waren etwa um den Faktor 10 geringer, und die Konzentration der Transkripte der zweiten Katalase, *mm2557*, lag etwa um den Faktor 100 unter der des Gens *gap*. Die relativen Transkriptmengen von *mm0632* und *mm0636* schwankten nur um einen Faktor von zwei.

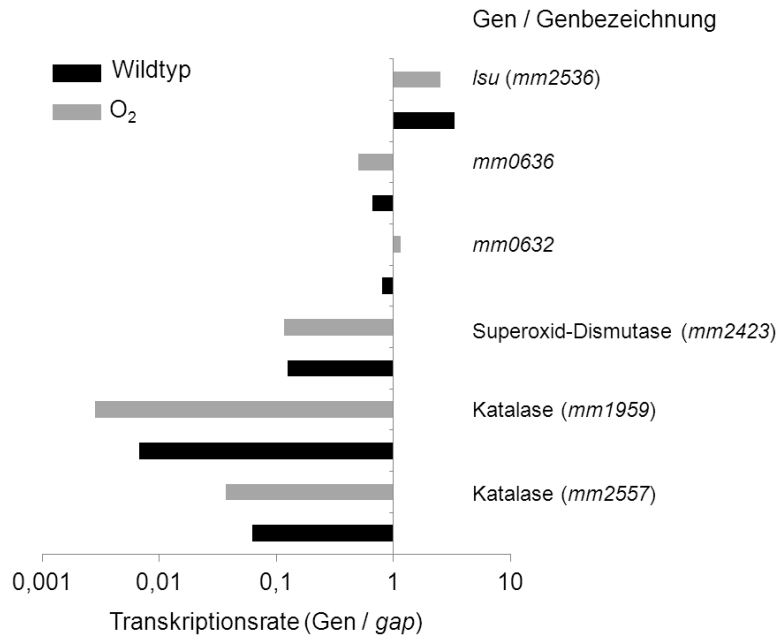


Abbildung 27: Transkripthäufigkeit ausgewählter Gene vor und nach einem Sauerstoffschock. Die ΔCt -Werte wurden mit der relativen mRNA-Menge des *gap*-Gens als Standard errechnet. Quotienten (x-Achse) wurden aus ΔCt -Werten und der Formel $2^{-\Delta Ct}$ berechnet. In schwarz ist das Transkriptionslevel der ungeschockten Wildtyp-Kultur, in grau ist die Transkriptmenge einer Sauerstoff-geschockten *Ms. mazei* Kultur (O₂) eingezeichnet.

3.2.5 Untersuchung des Proteins MM0633

Die bioinformatische Analyse des Proteins MM0633 hat ergeben, dass es sich um ein Cytochrom *c* mit fünf Häm-Bindestellen und einem C-terminalen Membrananker handelt. Membranständige *c*-Typ-Cytochrome sind in Prokaryonten oft Schlüsselenzyme in Elektronentransportketten. Aus diesem Grund, und da über Cytochrome aus *Archaea* nur sehr wenig bekannt ist, sollte das Protein MM0633 charakterisiert werden. Zum einen sollte MM0633 heterolog produziert werden, um es biochemisch zu charakterisieren, und zum anderen sollte mittels einer *Ms. mazei*-Mutante, in der das Gen *mm0633* deletiert wurde, Informationen über die Funktion des Proteins ermittelt werden.

Für die heterologe Produktion von MM0633 in *E. coli* mussten mehrere Eigenschaften des Proteins berücksichtigt werden. Zum einen sagt die Aminosäuresequenz fünf Häm *c*-Gruppen voraus, die über charakteristische CXXCH-Motive mit der Polypeptidkette verknüpft werden. Die Häm *c*-Gruppe wird durch zwei Thioether-Brücken zwischen der Vinyl-Gruppe des Häms und den zwei Cysteinen an die Polypeptidkette gebunden. Dieser Reifungsprozess findet bei *c*-Typ-Cytochromen nur im extrazellulären bzw. periplasmatischen Raum statt, daher muss in dem Produktionsorganismus *E. coli* das Apoprotein im ungefalteten Zustand in das Periplasma transportiert werden (189). Für diesen Transport muss das Apoprotein am N-Terminus die Sequenz eines Signalpeptids enthalten, das von den Sec-Transport-Proteinen erkannt wird (158). Die Faltung des Cytochroms findet nach dem Einbau der prosthetischen Gruppen im Periplasma von *E. coli* statt.

Überraschenderweise konnte am N-Terminus der Aminosäuresequenz von MM0633, wie sie in den Datenbanken hinterlegt ist, kein Signalpeptid identifiziert werden. Daher wurde die Sequenz stromaufwärts des annotierten Gens auf alternative Startcodons untersucht, unter der Annahme, dass in den Datenbanken der eigentliche Beginn des Gens fehlt. Tatsächlich wurden zwei weitere Startcodons im richtigen Leseraster gefunden, die das Protein um 17 bzw. 26 Aminosäuren verlängern (Abbildung 28). Das verlängerte Protein enthielt auch das gesuchte Signalpeptid. Vor beiden Startcodons befand sich das Adenin-Guanin-Motiv GGAAAG, das wahrscheinlich die Ribosomenbindestelle bildet, während sich vor dem Startcodon der in Datenbanken hinterlegten Sequenz keine erkennbare Ribosomenbindestelle befindet. Das Signalpeptid wurde mit dem Programm SignalP 3.0 untersucht. Von dem ersten Startcodon (TTG) und zweiten Startcodon (GTG) wurden das Signalpeptid und die Schnittstelle mit einer hohen Wahrscheinlichkeit vorhergesagt. Von dem dritten

Startcodon aus (TTG) wurde das Signalpeptid mit Schnittstelle nicht erkannt. Ob das erste oder das zweite Startcodon der tatsächliche Beginn des Gens ist, ist ungewiss, und könnte nur bestimmt werden, wenn das Protein aus *Ms. mazei* gereinigt würde. In Abbildung 29 ist das Protein ohne Signalpeptid schematisch dargestellt. Die fünf Häm-Bindestellen befinden sich alle im N-terminalen Bereich, der in den extrazellulären Raum hinausragt. Das Protein ist vermutlich über einen 22 Aminosäuren langen Abschnitt am C-Terminus in der Membran verankert.

TCT GGA AAG CCT GAA AAT

TTG AAC AAA ATA ACT GGG GGA AAG GCA **GTG** AAA AGC CCG GGA CTT
L N K I T G G K A V K S P G L

CTA AGT CTA ATC ATT ACT ATT CTT TTT GCA GGA **TTG** ATC ATA TTT GCC
L S L I I T I L F A G L I I F A

GGA GCC GCA GAG CCG AGT GGA CCC GGT GAT TTC ACA TCC AAT CAG TTT
G A// A E P S G P G D F T S N Q F

TCG AAA TCA GGA ATC TGT TCG AAC TGC CAT GGG AGC AGT TTC GGA GAA
S K S G I **C S N C H** G S S F G E

TGG GCC GGC TCC ATG CAT TCG CTT GCA GAC AGC GAC TTT TTT TAC AAT
W A G S M H S L A D S D F F Y N

GCA ATG CTT CAG GAA TAT GGT GTA GCT GCA GAA GCC CAG GGG CTT TCC
A M L Q E Y G V A A E A Q G L S

CCG GAG TTT TGT TCC CGT TGC CAC ACC CCT ATA GGA GTG GTT TCT TCC
P E F **C S R C H** T P I G V V S S

GAA ATA CCT CCC CTT GAT GGG TCT CAC CTG AGC GAA GTT TCA AAG GAA
E I P P L D G S H L S E V S K E

GGG GTA CAG TGT GAC TTC TGC CAT GTA GTT GCC GAA AGC GAA GGG ATC
G V Q **C D F C H** V V A E S E G I

GGA AAC GCC CCC TAT ATC CTT GAA CCG GGA AGT GTA AAA TGG GGA AAC
G N A P Y I L E P G S V K W G N

AGG GAG GAT GCA GAG TCT CCA TCC CAC GAA ACA GAG GGA CAT GAG TTT
R E D A E S P S H E T E G H E F

TAT GAC GAT TCA GCA TAC TGC GGC ATG TGC CAT AAC ATC TAC CAT CCG
Y D D S A Y **C G M C H** N I Y H P

GTA AAT AAT TTG ACT CTT GCA GCC ACA TAT ACG GAA TGG GAA GAA AGC
V N N L T L A A T Y T E W E E S

CCT TAC GCT GAA AAT GGG GTA AAC TGC CAA GCA TGC CAC ATG ACC CCC
P Y A E N G V N **C Q A C H** M T P

GGA ATT GTT AAA TTC GAA AAA AAT CCG GGA AAA GCT GCC TCA TCA GGC
G I V K F E K N P G K A A S S G

CCT AAG AGG GAA CAT GTT TAT ACT CAT CAC TTT GTG GGT GCA AAC GCT

```

P   K   R   E   H   V   Y   T   H   H   F   V   G   A   N   A
TTC GTA ACC GGT GAA ATG GGT GAA GGC AGG CAT GAA AAG AGA GCT ATT
F   V   T   G   E   M   G   E   G   R   H   E   K   R   A   I
GAG TAT CTC CAG AAC GCC GCA AAA CTT GAA GTA AAT GCT TCT GAT TCG
E   Y   L   Q   N   A   A   K   L   E   V   N   A   S   D   S
GCT GAA CCT GAT GAG AAT GTG GAA GTT GAA GTC AAA ATT ACG AAT GTA
A   E   P   D   E   N   V   E   V   E   V   K   I   T   N   V
GGA GCA GGG CAT AAA ATT CCA ACC GGA GTC ACC GAA GAA AGA GAA ATG
G   A   G   H   K   I   P   T   G   V   T   E   E   R   E   M
TGG CTT GAG CTT ACG GTA AGT GAT TCA GAA GGG AAG GCA CTT TAT CAT
W   L   E   L   T   V   S   D   S   E   G   K   A   L   Y   H
TCC GGA GCT CTT GAC AGC AAC GGT GGA ATT GAC CCC GAA GCA ACT GTC
S   G   A   L   D   S   N   G   G   I   D   P   E   A   T   V
TAC CAC ACA GTC TTT GCT GAT GCC GAT GGA AAG CCA ACA GTC AAG GTG
Y   H   T   V   F   A   D   A   D   G   K   P   T   V   K   V
TGG GAG GCA GCA AGC ATC TTT TCA GAC AAC AGG ATA GGC CCG AAA GAA
W   E   A   A   S   I   F   S   D   N   R   I   G   P   K   E
TCC GTA ATT GAA AAG CAT TCT TTC ATA ATG CCT GAA AAT GCT TCA AAC
S   V   I   E   K   H   S   F   I   M   P   E   N   A   S   N
CCT ATC AGT ACA AAG GCA ATT CTT CAC TAC AGG TCG GCT TCT CAG GTG
P   I   S   T   K   A   I   L   H   Y   R   S   A   S   Q   V
CAT ATT GAC GAG CTT TTC GGA GAA GGA GCC TAT GAT GTG CCT GTA ATT
H   I   D   E   L   F   G   E   G   A   Y   D   V   P   V   I
GAT ATG GCA ACA TAC CCT GAA GAA GAA GAA AAA TCA TCA ACT CCT GGA
D   M   A   T   Y   P   E   E   E   E   K   S   S   T   P   G
TTC GGA ATG CTT GGA GCA GTC GTC GCC CTC TCT CTG GGC AGC GTC TTC
F   G   M   L   G   A   V   V   A   L   S   L   G   S   V   F
AGA AGG ATT ATT CAG AAG GAT TAA
R   R   I   I   Q   K   D   Stopp

```

Abbildung 28: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *mm0633*. Die Nukleotidsequenz ist in der 5' → 3' Richtung abgebildet. Die Aminosäuren sind direkt unter dem ersten Nukleotid des Codons im Einbuchstabencode angegeben. Die drei möglichen Startcodons sind schwarz hinterlegt. Das Stoppcodon TAA wurde mit Stopp bezeichnet. Die Häm-Bindestellen mit der Aminosäurefolge CXXCH sind ebenfalls schwarz hinterlegt. Die Schnittstelle zwischen Signalpeptid und prozessiertem Protein ist durch einen doppelten Querstrich gekennzeichnet. Die Erkennungsstelle der Signalpeptidase und mögliche ribosomale Bindestellen sind unterstrichen.

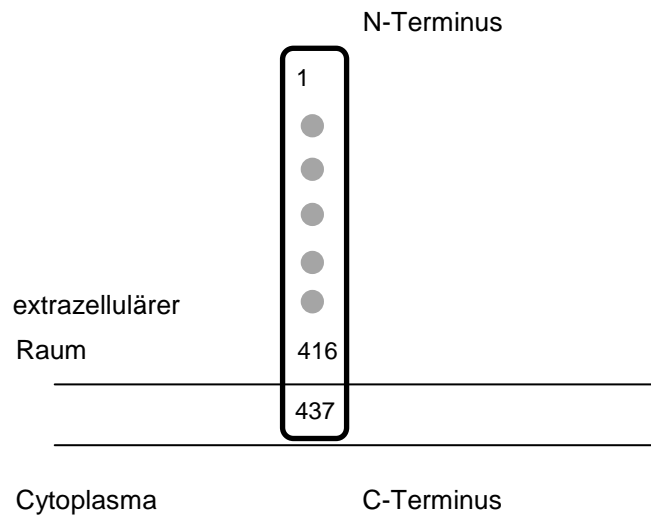


Abbildung 29: Schematische Darstellung von MM0633. Die Nummern geben die erste Aminosäure des Proteins ohne Signalpeptid, sowie die erste Aminosäure der Membranständigen Proteindomäne und die letzte Aminosäure von MM0633 an; graue Kreise symbolisieren die Häm-Gruppen.

In *E. coli* wird die Cytochrom *c*-Biogenese von den Enzymen katalysiert, die in dem Cytochrom-Reife-Gencluster kodiert sind (170). Die Gene werden nur unter anaeroben und nicht-fermentativen Wachstumsbedingungen exprimiert, da Cytochrome vom *c*-Typ in *E. coli* sonst nicht relevant sind. Die heterologe Produktion eines Cytochroms in *E. coli* müsste also unter Ausschluss von Sauerstoff und mit Trimethylaminoxid, Nitrat oder Nitrit als Elektronenakzeptor erfolgen. Um eine Produktion unabhängig von diesen Faktoren zu ermöglichen, wurden die Cytochrom *c*-Reifegene *in trans* auf dem Plasmid pEC86 eingebracht (10). In dieser Arbeit wurde *E. coli* zuerst mit pEC86 transformiert, bevor der Stamm mit den entsprechenden Plasmiden zur Produktion von MM0633 transformiert wurde.

3.2.5.1 Produktion und biochemische Analyse von Protein MM0633

In dem ersten Ansatz, in dem MM0633 mit dem nativen Signalpeptid in *E. coli* hergestellt werden sollte, konnte keine Produktion des Proteins nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden in den folgenden Experimenten auf die Signalpeptide von *E. coli*-Proteinen zurückgegriffen. Zum einen wurde das Gen in den Vektor pASK-IBA4 kloniert, der das Signalpeptid von OmpA nutzt und das Protein mit einem Strep-Tag fusioniert, sowie über einen Tetrazyklin-abhängigen Promotor verfügt. Ein weiteres Konstrukt basierte auf dem Vektor pET22b, der das Signalpeptid von PelB verwendet,

und das Insert unter die Kontrolle des T7-Promotors bringt. Der Vektor wurde in einem dritten Ansatz modifiziert, indem die Sequenz des His-Tags von pET22b durch die Strep-Tag-Sequenz ersetzt wurde. Die verschiedenen Vektoren wurden durch Sequenzierung überprüft.

Die Produktion von MM0633 mit den Signalpeptiden von *E. coli*-Proteinen war erfolgreich, sowohl mit dem Konstrukt pMM0633-4.2, das auf pASK-IBA4 basiert, als auch mit den beiden Varianten, die auf pET22b basieren (pET633 und pET633Strep). Abbildung 30 zeigt das mit Hilfe des Vektors pMM0633-4.2 produzierte Protein. Nach der Silberfärbung (Spur 1) waren zwei Banden bei 70 kDa und 55 kDa zu erkennen. Die Häm-Färbung (Spur 2) machte eine Bande auf der Höhe eines 55 kDa Proteins sichtbar. Die Position stimmte mit dem Signal der Silberfärbung bei 55 kDa überein. Das Apoprotein von MM0633 hat mit Strep-Tag ein Molekulargewicht von 48,3 kDa. Ein Häm *c* addiert ein Molekulargewicht von 0,684 kDa, was sich bei 5 Häm-Gruppen auf 3,42 kDa bzw. auf 52 kDa für das holo-Protein summiert. Die Signale bei 55 kDa wurden demnach durch MM0633 hervorgerufen. Das nicht prozessierte Protein mit OmpA-Signalpeptid hätte ein um 2,2 kDa größeres Molekulargewicht, und könnte eine Bande bei etwa 58 kDa hervorrufen. Die Proteinbande bei 70 kDa war jedoch größer, eventuell handelte es sich um ein Protein aus *E. coli*, das durch die Reinigungsprozedur nicht entfernt werden konnte.

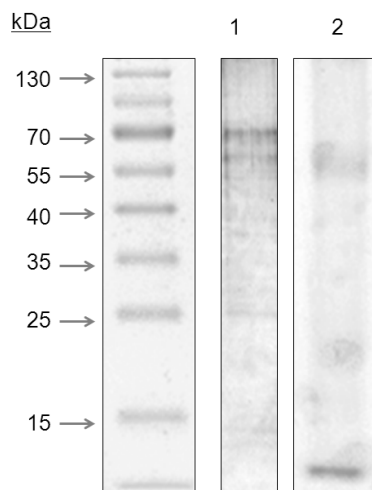


Abbildung 30: SDS-PAGE-Analyse des heterolog produzierten MM0633. (1) Silberfärbung nach SDS-PAGE (12,5 %). (2) Häm-Färbung nach SDS-PAGE. Aufgetragen wurde jeweils 2 µg Protein. Von oben nach unten weisen die Banden des Markers folgende Molekulargewichte auf: 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa.

Nach Sedimentation der Membranen des Produktionsstammes durch Ultrazentrifugation konnte MM0633 aus der löslichen Fraktion aufgereinigt werden, ohne dass Detergenzien erforderlich waren. Das bedeutete, dass das Protein nicht oder nur lose an die Zellmembran von *E. coli* gebunden war. Die Löslichkeit von MM0633 war unerwartet, denn das Protein besitzt einen C-terminalen Membrananker und wurde in dieser Arbeit durch Häm-Färbung (Kapitel 2.5.5.6) von *Ms. mazei*-Membranen (Abbildung 33) und in früheren Studien als eindeutig membranständig nachgewiesen (103).

Das gereinigte MM0633 hatte eine gelb-rötliche Farbe und das UV/Vis-Spektrum zeigte die typischen Absorptionsmaxima eines c-Typ-Cytochroms. In Abbildung 31 sind der Soret-Peak bei 411 nm, der α -Peak bei 549 nm und der β -Peak bei 521 nm zu erkennen. Nach Reduktion des Proteins mit Natriumdithionit verschob sich der Soret-Peak zu 417 nm. Das Verhältnis des Soret-Peaks und des Absorptionsmaximums der Aminosäuren bei 280 nm zeigten allerdings, dass nicht fünf Häm-Gruppen pro Protein gebunden waren. Eine Häm-Quantifizierung ergab ein Verhältnis von nur 0,5 mol Häm pro mol Protein.

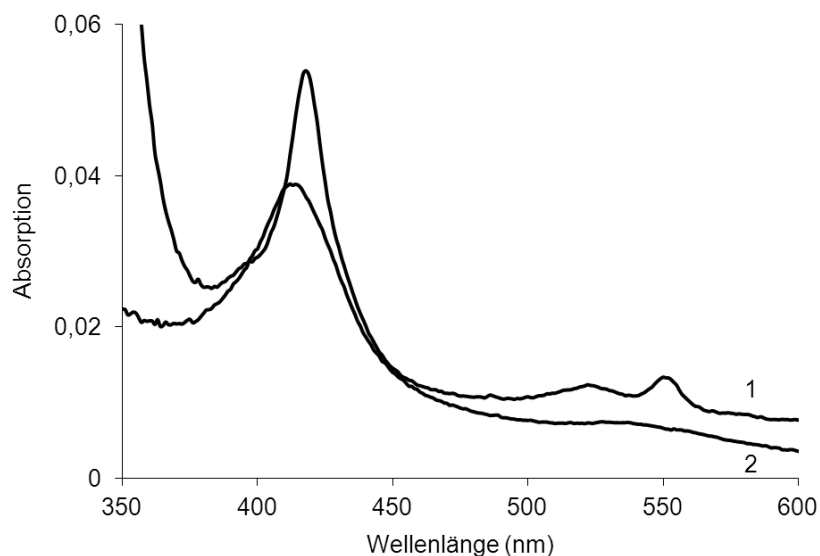


Abbildung 31: UV/Vis-Spektrum von MM0633 (2 mg ml^{-1}). (1) An Luftsauerstoff oxidiertes Protein; (2) mit Natriumdithionit reduziertes Protein.

Die auf pET22b basierenden Konstrukte pET633 und pET633Strep ermöglichten ebenfalls die Produktion von MM0633. Hier zeigte sich jedoch ein ähnliches Bild wie zuvor. Das Verhältnis von Protein zu Häm-Gruppe war mit 0,9 etwas höher, aber noch immer zu gering. Insgesamt war die Proteinausbeute größer, aber das Protein war ebenfalls in der löslichen Fraktion zu finden. Die besten Resultate wurden erzielt, wenn

auf eine Induktion verzichtet wurde, und die Proteinproduktion bei 25 °C für 16 Stunden erfolgte. Die Variation der Wachstumsbedingungen führte bei keinem der drei Konstrukte zu einem besseren Ergebnis. Es wurden verschiedene Inkubationszeiten gewählt, und neben sehr reichem MI-Medium, auch das Aminosäuren-reiche NZCYM-Medium, LB und Minimal-Medium getestet. Die Inkubationstemperatur wurde von 10 °C bis 37 °C variiert. Außerdem wurden verschiedene *E. coli*-Stämme verwendet, darunter DH5 α , BL21(DE3) pLys und BL21(DE3) C43/41.

Die SDS-PAGE-Analyse des Proteins, das mittels pET22b-Konstrukten produziert wurde, zeigte, dass das gereinigte Protein aus mehreren Fragmenten verschiedenen Molekulargewichts bestand, von denen mehrere mit einer Häm-Färbung nachweisbar waren (nicht gezeigt). Das Protein schien daher im aufgereinigten Zustand nicht stabil zu sein.

Da die Produktion von MM0633 in *E. coli* nicht erfolgreich war, wurde mit einem Wechsel zu *Wolinella succinogenes* als Produktionsstamm versucht, zum Erfolg zu kommen (108). Das Gen *mm0633* wurde synthetisch hergestellt (Geneart, Regensburg, Deutschland) und mit einem für *W. succinogenes* optimierten Codonsatz versehen. Anschließend erfolgte die Klonierung des synthetischen Gens in den entsprechenden Expressionsvektor, so dass das Gen mit einer Signalsequenz von *W. succinogenes* und einer Sequenz für den Strep-Tag fusioniert wurde. Die Häm-Färbung von *W. succinogenes*-Membranen zeigte, dass tatsächlich Protein produziert wurde. Im Gegensatz zu der Lokalisation in *E. coli* war das Protein in *W. succinogenes* in der Membranfraktion zu finden. Hier tat sich das Problem auf, dass das Protein nicht aus *W. succinogenes* isoliert werden konnte. Die gängigen Reinigungsmethoden für Membranproteine mit verschiedenen Detergenzien brachten kein Ergebnis und führten nicht zur Aufreinigung des Proteins MM0633 mit Strep-Tag.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in dieser Arbeit zum ersten Mal ein Cytochrom *c* aus methanogenen *Archaea* heterolog produziert und aufgereinigt werden konnte. Das so präparierte Protein war jedoch nicht vollständig mit Häm-Gruppen versehen und fand sich nach Zelllyse des *E. coli*-Wirtsstammes in der löslichen Fraktion, obwohl es in *Ms. mazei* membrangebunden vorliegt.

Das Protein MM0633 wurde trotz ungenügender Assemblierung von Häm *c*-Gruppen in einem Enzymtest untersucht. Die Reduktion und Oxidation des Cytochroms konnte anhand des UV/Vis-Spektrums verfolgt werden. In den hier durchgeführten Tests war das Enzym durch eine Elektronentransportkette aus NADPH, Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase und Ferredoxin aus *Clostridium pasteurianum* reduzierbar (Abbildung 32 B). Dass Ferredoxine gut Elektronen auf Cytochrom *c* übertragen

können, ist bekannt, stellt aber ein physiologisches Artefakt dar, da Ferredoxine im Cytoplasma zu finden sind, wohingegen Cytochrome des c-Typs im extrazellulären Raum vorliegen und somit *in vivo* keine Interaktion stattfinden kann.

In *Ms. mazei* übernimmt Methanophenazin die Funktion von Quinonen. Methanophenazin ist ein Hydroxy-Phenazin-Derivat, das über eine Etherbindung mit einer Penta-soprenoid-Einheit verknüpft ist (56). Für Enzymtests wurde nicht Methanophenazin verwendet, sondern wasserlösliches Hydroxy-Phenazin. Reduziertes Hydroxy-Phenazin war in der Lage, Elektronen an MM0633 weiterzugeben (Abbildung 32 A). Hydroxy-Phenazin wurde chemisch mit H₂ und einem Nickel-Katalysator reduziert und als Elektronendonator für MM0633 eingesetzt. Anhand der Absorptionsmaxima des Cytochroms konnte gezeigt werden, dass reduziertes Hydroxy-Phenazin als Elektronendonator für MM0633 fungiert. Während vor der Zugabe des reduzierten Hydroxy-Phenazins der Soret-Peak bei 413 nm zu erkennen war, lag er nach Reduktion von MM0633 durch Hydroxy-Phenazin bei 417 nm. Der α-Peak und der β-Peak des Cytochroms waren vor der Zugabe nicht zu erkennen. Nach der Zugabe wurde der α-Peak bei 549 nm sichtbar. Der β-Peak wurde wahrscheinlich durch das bei 480 nm stark absorbierende Hydroxy-Phenazin überdeckt. Der Soret-Peak von oxidiertem MM0633 lag bei 411 nm, während er in der Abbildung 32 (A) bei 413 nm zu erkennen war, das bedeutet, dass in dem gezeigten Test MM0633 schon zu Beginn teilweise reduziert vorlag.

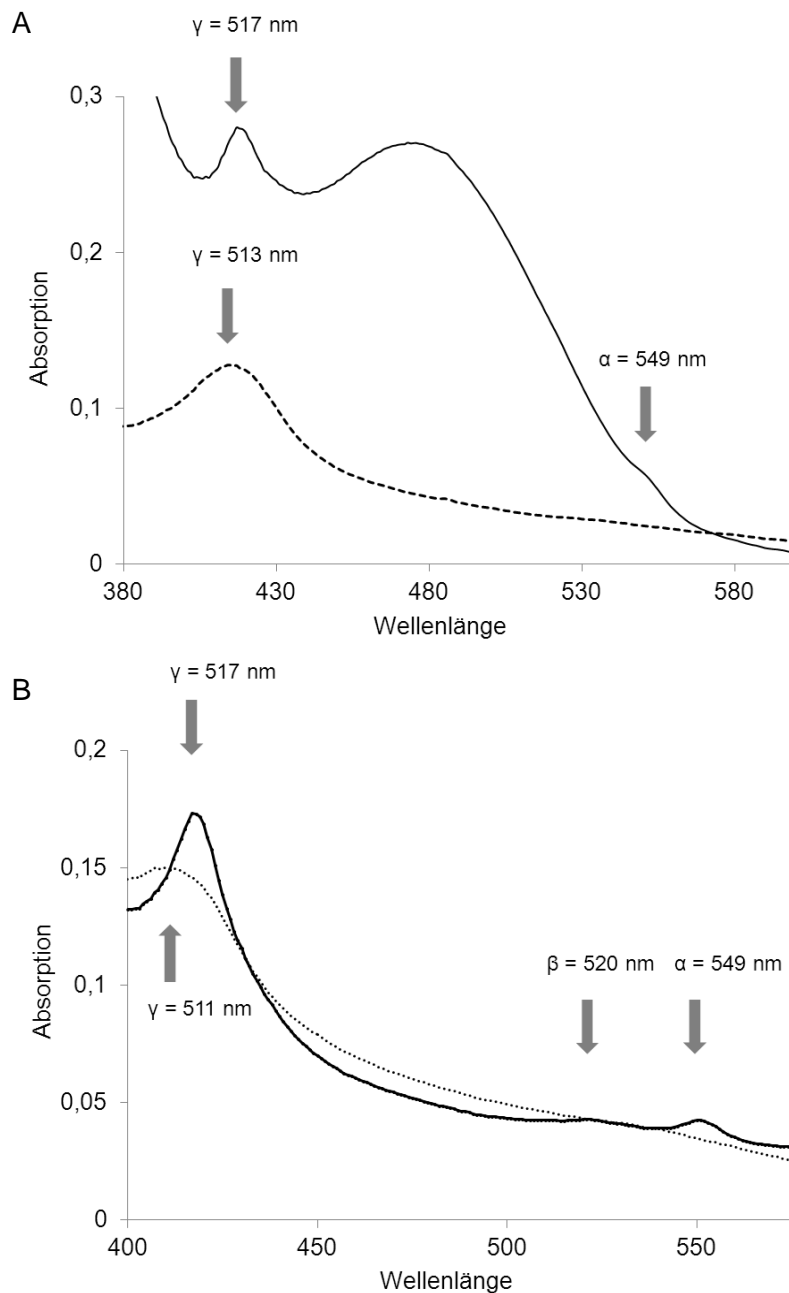


Abbildung 32: UV/Vis-Spektrum von MM0633 vor und nach der Reduktion durch Ferredoxin sowie Hydroxy-Phenazin. (A) Reduktion von MM0633 (6 μM) durch reduziertes Hydroxy-Phenazin (15 μM); (- - -) vor der Zugabe von Hydroxy-Phenazin, (—) nach der Zugabe von Hydroxy-Phenazin. (B): Reduktion von MM0633 (6 μM) durch Ferredoxin (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Ferredoxin wurde durch die Ferredoxin:NADP⁺-Oxidoreduktase (0,06 μM) und NADPH (500 μM) reduziert; (.....) vor der Zugabe von Ferredoxin, (—) nach der Zugabe von Ferredoxin.

3.2.5.2 Erzeugung und Charakterisierung einer *mm0633*-Deletionsmutante von *Ms. mazei*

In weiteren Experimenten wurde der Versuch unternommen, durch die Erzeugung einer *Ms. mazei* $\Delta mm0633$ -Mutante Aufschluss über die Funktion des Proteins *in vivo* zu erlangen. Zur Generierung der Deletionsmutante wurde der Suizidvektor pJK3 verwendet und das intakte Gen über den Vorgang der doppelt-homologen Rekombination durch eine Puromycin-Resistenzkassette ersetzt. Die Mutante wurde durch Sequenzierung eines großen DNA-Bereichs um die Rekombinationsstelle überprüft. Die Richtigkeit der Mutante wurde zudem durch eine Häm-Färbung der isolierten Membranfraktionen vom Wildtyp und der Mutante nach SDS-PAGE bestätigt. Die Abbildung 33 zeigt deutlich, dass in der Membranfraktionen der Mutante das Signal von MM0633 bei 38 kDa fehlt. Im Wildtyp besitzt MM0633 ohne Signalpeptid und mit 5 Häm-Gruppen ein Molekulargewicht von 52 kDa; die SDS-PAGE zeigte also ein zu geringes Molekulargewicht. Von membranständigen Proteine ist allerdings bekannt, das sie sich in einer SDS-PAGE-Analyse oft nicht ihrer Größe entsprechend verhalten (162). Neben dem *c*-Typ-Cytochrom MM0633 besitzt *Ms. mazei* noch zwei kleine *b*-Typ Cytochrome (VhoC und HdrE), die in der Häm-Färbung bei 20 kDa zu erkennen waren

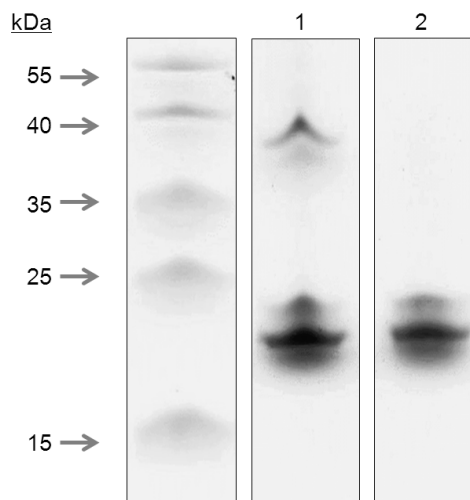


Abbildung 33: Häm-Färbung nach SDS-PAGE (12,5 %) von isolierten *Ms. mazei*-Membranen. Aufgetragen wurden jeweils 5 μ g Protein. (1) Wildtyp; (2) $\Delta mm0633$ -Mutante. Der Marker zeigt von oben nach unten folgende Banden: 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa.

Zur Charakterisierung der *Ms. mazei* $\Delta mm0633$ -Mutante wurde das Wachstum mit TMA, Methanol (MeOH) oder Acetat als Substrat beobachtet und die

Wachstumsparameter bestimmt. Die Verdopplungszeiten und die maximal erreichten optischen Dichten von $\Delta mm0633$ -Mutante und Wildtyp waren mit TMA, MeOH und Acetat als Substrat fast gleich (Tabelle 1). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass das Cytochrom *c*-Protein MM0633 keine oder nur eine untergeordnete Rolle im Zentralstoffwechsel und in der Methanogenese spielt, da ansonsten Unterschiede im Wachstumsverhalten zu erwarten wären.

Tabelle 1: Verdopplungszeiten und End-OD₆₀₀ von *Ms. mazei* bei Wachstum mit TMA, MeOH und Acetat.

Verdopplungszeit [h]	TMA	MeOH	Acetat
<i>Ms. mazei</i> WT	7,6 ± 0,3	13,1 ± 2,1	32,4 ± 2,2
$\Delta mm0633$ -Mutante	7,4 ± 0,4	13,0 ± 0,2	27,8 ± 3,1
End-OD ₆₀₀	TMA	MeOH	Acetat
<i>Ms. mazei</i> WT	2,4 ± 0,2	2,1 ± 0,2	0,61 ± 0,2
$\Delta mm0633$ -Mutante	2,5 ± 0,1	2,1 ± 0,1	0,65 ± 0,2

In Prokaryonten katalysieren zahlreiche unterschiedliche *c*-Typ-Cytochrome den Transfer von Elektronen auf einen externen Elektronenakzeptor, darunter beispielsweise die Nitrit-Reduktase aus *W. succinogenes* oder die TMAO- und DMSO-Reduktase aus *E. coli* (138, 179). Wendet man dieses Schema auf *Ms. mazei* an, könnte das Cytochrom MM0633 ebenfalls Elektronen auf einen bislang unbekanntem Akzeptor im extrazellulären Bereich transferieren. Da MM0633 über einen Membrananker verfügt, könnte es mit dem Methanophenazinpool der Membran wechselwirken.

Mit Membranpräparationen der Mutante im Vergleich zum Wildtyp sollte eine Beteiligung von MM0633 am Elektronentransport über die Membran auf verschiedene Akzeptoren nachgewiesen werden. Für diesen Test wurde ein Donor benötigt, der Elektronen in die Membran einspeist. Der Kofaktor F₄₂₀H₂ kann von dem membrangebundenen Enzym F₄₂₀H₂-Dehydrogenase oxidiert werden, welches die Elektronen an den Phenazinpool weitergibt (1). Überträgt nun MM0633 Elektronen aus dem Phenazinpool an einen extrazellulären Akzeptor, kann diese Aktivität über die Absorption von oxidiertem F₄₂₀ bei 420 nm beobachtet werden. Bei der Mutante sollte diese Aktivität wiederum nicht detektierbar sein, da MM0633 als Vermittler ausfällt.

Bei diesem Test wurden F₄₂₀H₂ als Elektronendonator und folgende Substanzen als Elektronenakzeptoren eingesetzt: Natriumnitrat, Kaliumnitrit, Natriumsulfit, Trimethylaminoxid, Natriummanganat, und Huminsäure. Außerdem wurden

verschiedene Eisenverbindungen verwendet: Eisen-EDTA, Eisen-Citrat sowie EDTA und Citrat als Kontrolle.

In den Tests konnte für Huminsäure und Eisen eine Aktivität bestimmt werden (nicht gezeigt). Ohne Membranzugabe zeigte sich in beiden Fällen keine Aktivität. Da Huminsäure ein komplexes Gemisch organischer Säuren ist und auch Verunreinigungen mit Eisen nicht ausgeschlossen sind, kann Huminsäure nicht als definierter Elektronenakzeptor gelten. Eventuell reagierte nur das verunreinigende Eisen mit der Membran. Beide Reaktionen wurden sowohl von der Wildtypmembran, als auch von der Membran der $\Delta mm0633$ -Mutante katalysiert; das heißt, dass die Aktivitäten mit Eisenionen und Huminsäure unabhängig von MM0633 waren. Somit ließ sich keine abschließende Aussage über die Funktion des *c*-Typ-Cytochroms in *Ms. mazei* machen.

3.2.6 Charakterisierung des Proteins MM0634

3.2.6.1 Sequenzvergleich von MM0634

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von MM0634 mit der NCBI-Proteindatenbank lieferte zahlreiche homologe Proteine aus anderen Methanarchaea wie *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanococcus maripaludis*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* und *Methanosaeta thermophila*. Insgesamt zeigten 24 Proteine einen Alignmentsscore von größer als 200 (Abbildung 34). Während *M. jannaschii*, *M. maripaludis* und *M. thermoautotrophicum* nur auf H₂ und CO₂ wachsen können, ist *M. thermophila* auf Acetat spezialisiert (36, 86, 180, 181). *Ms. mazei* gehört der Gruppe der *Methanosarcinales* an, die als einzige methanogene *Archaea* in der Lage sind, verschiedene methylierte C₁-Verbindungen zu Methan zu reduzieren (56). MM0634 ist also in physiologisch diversen Methanarchaea weit verbreitet.

MM0634 teilt sich mit einer großen Anzahl von Flavoproteinen eine charakteristische Flavodoxin-ähnliche Domäne. Die Sequenz eines Flavodoxins von Aminosäure 52 bis 126 aus *Clostridium butyricum* (ZP_02949402) war mit dem Abschnitt von Aminosäure 85 bis 164 der Sequenz von MM0634 zu 28 % identisch, wahrscheinlich lassen sich beide Proteine auf ein Vorgängerprotein zurückführen.

Zu einer Proteinfamilie, die ebenfalls als Flavodoxin-ähnlich bezeichnet wird, gehört die WrbA-Familie (79). Das Protein aus der Erstbeschreibung der Familie wurde zusammen mit dem Tryptophan-Repressor Trp aufgereinigt, weshalb das Protein als Tryptophan (W)-Repressor-Bindeprotein A (WrbA) bezeichnet wurde (204). Zu einem WrbA-Protein aus *E. coli* (NP_350091) wies MM0634 eine zu 32 % identische Sequenz auf.

Der direkte Sequenzvergleich in Abbildung 34 von MM0634 mit dem Flavodoxin und Vertretern der WrbA-Familie zeigte, dass in der Mitte der Sequenz von MM0634 vier Cysteine vorhanden sind, die in der Sequenz des Flavodoxins und WrbA aus *C. acetobutylicum* nicht vorkommen. Die Cysteine in MM0634 sind in einem ungewöhnlich kompakten CXXCXXCX₆C -Motiv organisiert, das auch in zahlreichen anderen Proteinen konserviert ist. Ein CXXCXXCX_xC-Motiv findet sich außerdem in unterschiedlichen Eisen-Schwefel-Proteinen, zum Beispiel Ferredoxinen (*Geobacter* sp. FRC-32 [YP_002535692]) wieder. Demnach ist das CXXCXXCX₆C-Motiv mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Bindung eines Eisen-Schwefel-Clusters in MM0634 verantwortlich.

```

WrbA                MAKVLVLYYSMYGH IETMARAVAEGASKVDGAEVVVKRVPETMP PQLFEKAGGKTQTAPV 60
Flavodoxin         -  MKISIIYSSRTGKTERVAQLIKEGVERVKGIDVKLMNLQDENS----- 43
MM0634              -  MQETEAKPIRILGISGSPRNMATDYL VQEALKIAKEKYGAET EY----- 44
                    :      .      . : : .      . . . : .

WrbA                ATPQELADYDAIIFGTPTRFRGNMSGQMRTFLDQTGGLWASGALYKGLASVFSSTG--TGG 118
Flavodoxin         -  IDKDFINNSDGIIFGTPTYANI AWELKKWIDES----TEYKLEGLKLGATFATANS-IAG 98
MM0634              -  ----FSAKGKKNF■IH■DF■IRKKEG■LHKDDIAAELYDKMIWADAWIIGTPVYQGTIS 100
                    . . . : *      :      :      * :      . . . : . . .

WrbA                GQEQTITSTWTTLAHHGMVIVPIGYAAQELFDVSQVRGGTPYG-ATTIAGGDSRQPSQE 177
Flavodoxin         -  GADIALLLTIVNHLMVKGMVY-----SGGVAFGKPKTHIGYVHINEICEN 143
MM0634              -  AQTKTIMDRCRAVVARDPKVFLN-----KVGMIADGGDRIGG---QEP AIQ 144
                    .      : :      :      :      :      *      .      *      . : . :

WrbA                ELSIARYQGEYVAGLAVK LING 198
Flavodoxin         -  EDENARIFGERIANKV NKIF- 163
MM0634              -  TIHTFYIINEMIPVGGG SFG- 164
                    . * : .      . :

```

Abbildung 34: Alignment der Aminosäuresequenzen von MM0634, einem Flavodoxin-ähnlichen Protein und einem Flavodoxin. Sterne zeigen übereinstimmende Aminosäuren, Punkte konservative Substitutionen und Doppelpunkte semi-konservative Substitutionen. Die abgebildeten Sequenzen gehören zu den folgenden Organismen und Proteinen: MM0634: *Ms. mazei* Gö1 (NP_632658); WrbA: *E. coli* str. K-12, Flavodoxin-ähnlich (NP_415524); Flavodoxin: *Clostridium. butyricum* DSM5521 (ZP_02949402). Die Cysteine des CXXCXXCX₆C-Motivs von MM0634 sind schwarz hervorgehoben.

Homologe Proteine zu MM0634 sind in zahlreichen methanogenen Organismen und verschiedenen anderen Prokaryonten vorhanden. Über die Funktion der Proteinfamilie ist jedoch nur wenig bekannt. Das WrbA-Enzym von *E. coli* wurde als NADPH:Chinon-Oxidoreduktase beschrieben, es wird vermutet, dass das Protein bei der Stressantwort eine Rolle spielt (152). Ein Protein aus *Methanosarcina thermophila* (Q50562), das ebenfalls eine Flavodoxin-ähnliche Domäne und ein kompaktes Cystein-Motiv enthält, wurde als Prototyp einer neuen Proteinfamilie beschrieben, die als Eisen-Schwefel-Flavoproteine (Isf) bezeichnet wurde (207). Das Protein wurde in *E. coli* produziert und durch Mutation der Cysteine und ESR-Spektroskopie konnte demonstriert werden, dass das Cystein-Motiv ein [4Fe-4S]-Cluster bindet (120). Außerdem wurden die Redoxpotentiale der prosthetischen Gruppen und die Struktur des Proteins bestimmt (15). Für das Isf-Protein aus *Ms. thermophila* wurde vorgeschlagen, dass es eine Wasserstoffperoxid- und Sauerstoff-reduzierende Aktivität in dem Organismus ausübt (52).

Das Isf-Protein aus *Ms. thermophila* weist eine Identität von 39 % zu dem Protein MM0497 von *Ms. mazei* auf. MM0497 ist eines von insgesamt 10 paralogen Proteinen zu MM0634, die alle als Eisen-Schwefel-Flavoprotein unbekannter Funktion annotiert

sind. Acht dieser Paraloge besitzen ein CXXCXXCX₍₄₋₇₎C-Motiv und zwei weitere Proteine haben ein leicht abgewandeltes Motiv aus vier Cysteinen (CX₍₅₎CXXCX₍₄₎C bzw. CXXCXXCX₍₁₀₎C). Wahrscheinlich binden alle paraloge Flavoproteine ein Eisen-Schwefel-Zentrum. Abbildung 35 zeigt ein Kladogramm der paraloge Proteine, der die Aufteilung in verschiedene Untergruppen deutlich macht. Der Sequenzanalyse zufolge ist MM0497 dem Protein MM0634 am ähnlichsten, während die anderen Proteine Untergruppen bilden und wahrscheinlich unterschiedliche Funktionen in der Zelle übernehmen. In dem Genom von *Ms. mazei* ist auch ein Vertreter der WrbA-Familie kodiert (MM2224), der kein Eisen-Schwefel-Cluster besitzt.

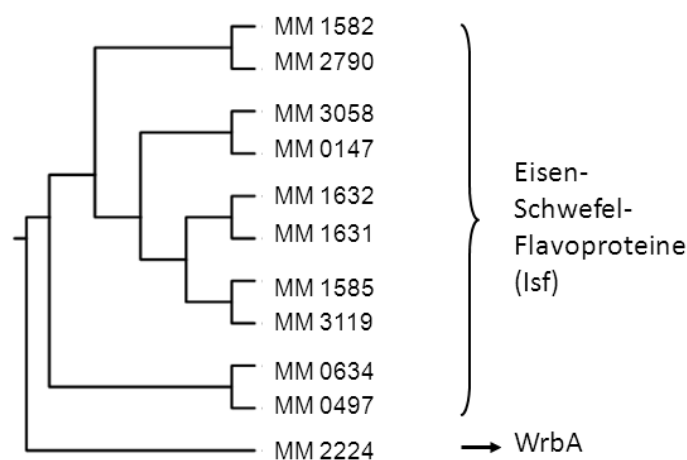


Abbildung 35: Phylogenetische Analyse der Paraloge zu MM0634. Von den dargestellten Proteinen sind zehn Proteine Vertreter der Isf-Proteinfamilie. MM2224 enthält keine Cysteine und ist homolog zu WrbA-Proteinen. Der phylogenetische Stammbaum wurde mit dem Alignment-Programm PRRN erstellt (<http://align.genome.jp/prrn/>).

3.2.6.2 Charakterisierung des rekombinanten Proteins MM0634

Obwohl Isf aus *Ms. thermophila* bereits charakterisiert wurde, ist über die physiologische Funktion des Proteins nichts bekannt. Um Untersuchungen über die Funktion von MM0634 vorzunehmen, wurde das Gen in den Vektor pASK-IBA3 kloniert, das resultierende Plasmid durch Sequenzierung überprüft, und nach Transformation erfolgreich in *E. coli* exprimiert. Das Protein eluierte mit einer intensiv gelb-bräunlichen Färbung von der Affinitätsmatrix. Da angenommen wurde, dass das Eisen-Schwefel-Cluster Sauerstoff-labil ist, wurde das Protein anaerob produziert und aufgereinigt.

Die Proteinfärbung im SDS-Gel und eine Immunofärbung mit einem Anti-Strep-Tag-Antikörper zeigte eine einzige deutliche Bande bei 25 kDa (Abbildung 36).

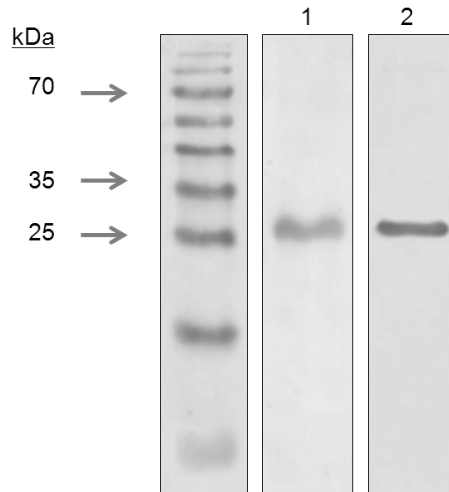


Abbildung 36: SDS-PAGE-Analyse von heterolog produziertem MM0634. (1) Silberfärbung nach SDS-PAGE (12,5 %). (2) Nachweis des Strep-Tags von MM0634 durch Antikörperfärbung. Aufgetragen wurde jeweils 2 µg Protein. Als Marker diente der vorgefärbte Proteinmarker. Von oben nach unten wiesen die Banden des Markers folgende Molekulargewichte auf: 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa.

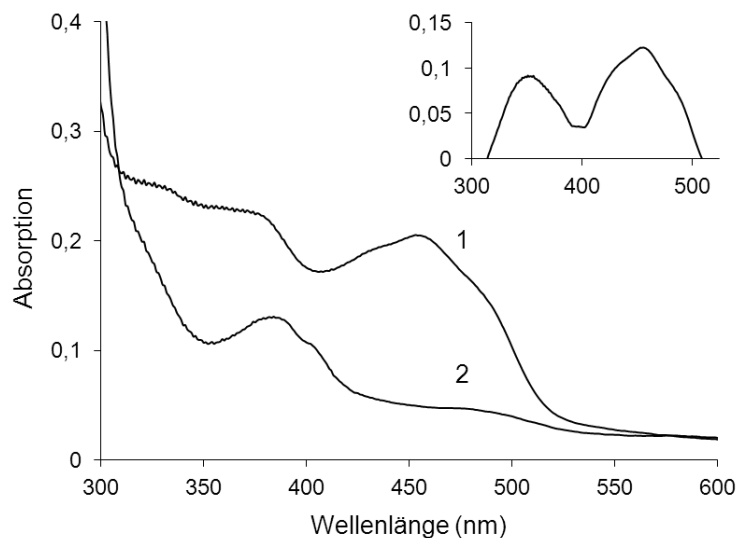


Abbildung 37: UV/Vis-Spektrum von MM0634. (1) Oxidierter Zustand des Proteins ($1,3 \text{ mg ml}^{-1}$) nach Zugabe einer äquimolaren Menge Wasserstoffperoxid. (2) Reduzierter Zustand des Proteins nach Zugabe von Natriumdithionit. Das Differenzspektrum der Absorption des oxidierten minus reduzierten Proteins ist als Einschub dargestellt.

Das UV/Vis-Spektrum von MM0634 wies eine für Flavine charakteristische Absorption auf mit Maxima bei 484, 452, 430 und 384 nm, die auch bei Isf aus *Ms. thermophila* gefunden wurden (Abbildung 37). Nach Reduktion des Proteins mit Natriumdithionit

verschwand der größte Teil der Absorption, außer zwei Maxima bei 384 und 410 nm, die auch bei Zugaben von Natriumdithionit im Überschuss noch vorhanden waren. Das reduzierte Spektrum ließ sich durch Inkubation an Luftsauerstoff schnell wieder oxidieren, was MM0634 als Redox-aktives Protein kennzeichnet.

Bei Prokaryonten kommen zwei Flavine proteingebunden vor, FAD und FMN. In dem selteneren Fall sind sie kovalent mit dem Protein verknüpft, meistens aber liegt eine nicht-kovalente Bindung an das Apoprotein vor. Das Flavin von MM0634 sollte mittels HPLC-Analyse identifiziert und photometrisch quantifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde das Flavin durch Proteinfällung von der Polypeptidkette getrennt und mittels HPLC mit FMN und FAD als Standard verglichen. Abbildung 38 zeigt das HPLC Profil des isolierten Flavins von MM0634, sowie die Standards FMN und FAD. FAD eluierte nach 11,5 min, während FMN und die Flavinpräparation von MM0634 beide nach 18 Minuten eluierten.

Die Untersuchung zeigte, dass MM0634 ein FMN gebunden hat. Die photometrische Quantifizierung ergab, dass pro Monomer $0,4 \pm 0,2$ FMN gebunden waren.

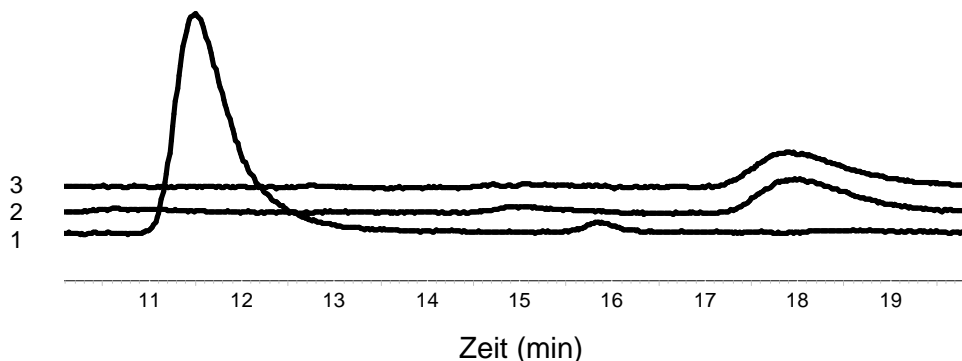


Abbildung 38: HPLC-Analyse des Flavin-Kofaktors von MM0634. (1) Elutionsprofil von FAD; (2) Elutionsprofil von FMN; (3) Elutionsprofil der Flavinpräparation von MM0634. Die X-Achse zeigt die Elutionszeit in Minuten, die Y-Achse zeigt die relative Absorption bei 436 nm.

Nach der Analyse des Flavins wurde das Eisen-Schwefel-Cluster mit chemischen Methoden analysiert. Die Eisen-Schwefel-Bestimmung ergab einen Wert von $1,48 \pm 0,4$ Eisen und $1,0 \pm 0,7$ Schwefel für MM0634. Es kann angenommen werden, dass das Protein aus *Ms. mazei* neben dem FMN-Kofaktor ein Eisen-Schwefel-Cluster bindet, wie dies auch für das homologe Protein aus *Ms. thermophila* gefunden wurde.

Mit einem Enzymtest wurde untersucht, ob Ferredoxin als Elektronendonator für MM0634 fungieren kann. Ferredoxine konnten mittels der Enzyme Ferredoxin:NADP⁺-Oxidoreduktase aus *Spinacia oleracea* und der CO-Dehydrogenase aus *Mta. thermoacetica* reduziert werden, die NADPH bzw. CO als Elektronendonor verwenden.

Abbildung 39 zeigt die Reduktion von MM0634 durch CO und die CO-Dehydrogenase, die anhand der Absorption des Flavinkofaktors bei 450 nm verfolgt wurde. Das Protein konnte nur reduziert werden, wenn dem Ansatz Ferredoxin zugegeben wurde. Ohne Ferredoxin war lediglich eine geringe Hintergrundaktivität zu beobachten, die durch das in dem Puffer enthaltene DTE hervorgerufen wurde. Auch die Reduktion von MM0634 mit NADPH der Ferredoxin:NADP⁺-Oxidoreduktase war strikt abhängig von Ferredoxin (nicht gezeigt).

In dieser Arbeit wurde Ferredoxin aus *C. pasteurianum* verwendet und das Ferredoxin MM1652 aus *Ms. mazei*, das heterolog in *E. coli* produziert wurde (zur Verfügung gestellt von C. Welte, Universität Bonn). Die Reduktion von MM0634 mit MM1652 als Elektronendonor verlief mit ähnlichen Raten wie bei der Verwendung von Ferredoxin aus *C. pasteurianum*. F₄₂₀H₂, NADH oder NADPH konnten nicht als Elektronendonor für MM0634 dienen und die oxidierten Formen der Kofaktoren fungierten auch nicht als Elektronenakzeptor.

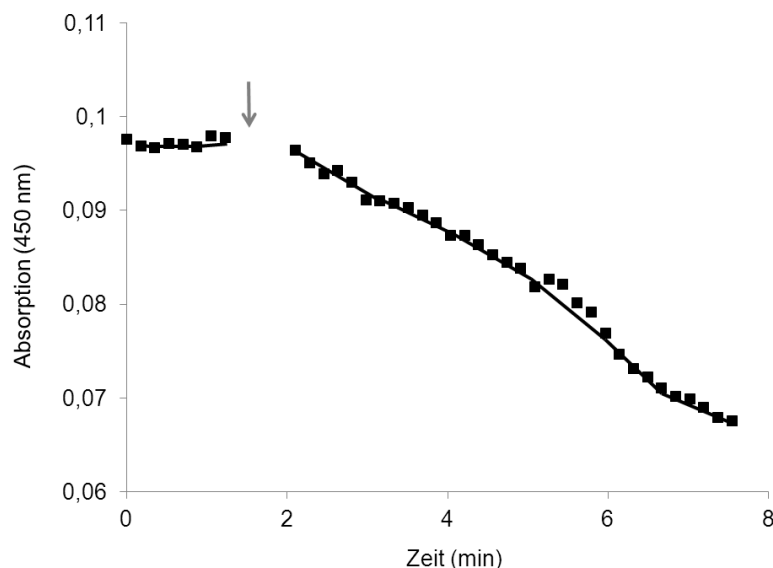


Abbildung 39: Reduktion von MM0634 durch Ferredoxin. MM0634 (24 µM) wurde durch CO, CO-Dehydrogenase (3 µg ml⁻¹) und Ferredoxin aus *C. pasteurianum* (5 µg ml⁻¹) reduziert. Die Aktivität wurde anhand der Absorption der prosthetischen Gruppe von MM0634, FMN, verfolgt. Der Pfeil kennzeichnet die Zugabe der CO-Dehydrogenase zu den übrigen Komponenten.

3.2.7 Untersuchungen zum Protein MM0635

3.2.7.1 Sequenzvergleich von MM0635

Das Protein MM0635 ist ein in *Archaea* verbreitetes Flavoprotein, das als AfpA (Archaea-Flavo-Protein) bezeichnet wird (59). Abbildung 40 zeigt ein Alignment mit fünf Proteinen, die dem Protein MM0635 ähnlich sind. Die Proteine aus *Ms. acetivorans* und *Ms. barkeri* hatten eine zu 90 % bzw. 92 % identische Aminosäuresequenz. Die Proteine aus *M. evestigatum*, *M. burtonii* und *M. mahii* waren zu 72 % identisch.

Ähnlichkeiten von etwa 40 % zeigte MM0635 mit Proteinen von Vertretern aus den Ordnungen *Methanococcales* (*Methanococcus*- und *Methanocaldococcus*-Spezies), und *Methanobacteriales* (*Methanothermobacter*- und *Methanothermus*-Spezies) sowie zu Proteinen aus *Archaeoglobus fulgidus*. Ein genauer Abgleich der Proteinsequenz von MM0635 mit Proteinen der NCBI-Proteindatenbank brachte eine strukturelle Ähnlichkeit von AfpA-Proteinen zu Proteinen der DfpA-Familie ans Licht (Abbildung 41). Das Enzym DfpA aus *E. coli* ist an der Biosynthese von Coenzym A beteiligt (115). Auch zu dem Flavoprotein EpiD aus *Staphylococcus*-Spezies besteht eine strukturelle Verwandtschaft (20). EpiD katalysiert die Decarboxylierung von Cystein an einem Vorgängermolekül eines Peptidantibiotikums aus der Lantibiotikum-Familie (116). Während sich die aktiven Zentren und Substratbindestellen von DfpA und EpiD in der Sequenz von AfpA nicht wiederfinden, haben die strukturell verschiedenartigen Enzyme jedoch die Aminosäuren gemein, die die Flavinbindestelle aufbauen. Die Proteine AfpA, DfpA und EpiD sind alle Vertreter der HFCD-Protein-Superfamilie (homo oligomeric flavin containing cystein decarboxylase). Abbildung 41 zeigt den Vergleich der Sequenz von MM0635, DfpA und EpiD. Während die Sequenzähnlichkeit gering war, und DfpA aus mehr Aminosäuren bestand als die beiden anderen Proteine, fand sich die Flavinbindestelle in allen Sequenzen wieder.


```

EpiD      -----MYGKLLICATAS-INVININHIVELKQHF-DEVNILFSPSSKNFINTDVLKL 51
Dfp      ----MSLAGKKIIVLGVSGG-IAAYKTPELVRRLRDRG-ADVVRVAMTEAAKAFITPLSLQA 54
MM0635   MVESLDKQVKRIAWGITGSGDQMIETYSILVDIKNRTGVEITMFLSKEGETVMKWYHLWD 60
          ::      :..      :      :      ::::      :. : : :      :. :..      *

EpiD      FC-----DNLYDE-IKDPLLNHINIVENHEYILVLPASANTINKIANGICDNLLT---TV 102
Dfp      VSGYPVSDSLDP-AAEAAMGHIELGKWADLVILAPATADLIARVAACMANDLVS---TI 110
MM0635   KIQNDFPNFKVDAGPNSPFIAGPLQMGYYDFLLIAPATANTVAKIVYGIADTLVTVNAVSO 120
          :      *      ..      :      ::::      **:*      : :.      *..:      *::      :

EpiD      CLTGYQKLFIFPNMNMIRMWGNPFLQKNIDLLKNNNDVKVYSPDMN--KSFEISSGRYKNNI 160
Dfp      CLATPAPVAVLPAMNQMYRAAATQHNLEVLASRGLLIWGPDSGSQACGDIGPGRMLDPL 170
MM0635   TAKGKTPIFILPVDQKRGTVKTAAPS-----GRAFELTMREVDVTNSEKLAQMENINIL 174
          : ::*      : :      .      .. :      : .      . :.      . : :

EpiD      TMPNIEN-----VLFVFLNN--EKRPDL----- 181
Dfp      TIVDMAVAHFSPVNDLKHLNIMITAGPTREPLDPVRYISNHSSGKMGFAIAAAAARRGAN 230
MM0635   TSPYEIYDIFGIERPTEDITVKVREQKRKKAKKVAES----- 211
          *      :.. :      :.. .

EpiD      ----- 290
Dfp      VTLVSGPVSLETPPFVVKRVDVMTALEMEAAVNASVQQQNIFIGCAAVADYRAATVAPEKI 290
MM0635   -----

EpiD      ----- 350
Dfp      KKQATQGDELTIKMKVKNPDIVAGVAALKDHRPYVVGFAAETNNVEEYARQKRIRKLNLDLI 350
MM0635   -----

EpiD      ----- 406
Dfp      CANDVSQPTQGFSNDNNALHLFWQDGDKVLPLERKELLGQLLLDEIVTRYDEKNRR 406
MM0635   -----

```

Abbildung 41: Alignment der Aminosäuresequenzen von MM0635 sowie der Proteine EpiD und DfpA. Charakteristische Aminosäuren, die an der Flavin-Bindung beteiligt sind, sind schwarz hervorgehoben. Sterne zeigen übereinstimmende Aminosäuren, Punkte konservative Substitutionen und Doppelpunkte semi-konservative Substitutionen. Dargestellt sind folgende Proteine: EpiD: *Staphylococcus epidermidis*, Epidermin-Decarboxylase (P30197); Dfp: *E. coli* str. K-12 substr. W3110, NA/Pantothenat-Metabolismus (AP_004152); MM0635: *Ms. mazei* (NP_632659).

3.2.7.2 Charakterisierung des rekombinanten Proteins MM0635

In dieser Arbeit wurde das Gen *mm0635* in den Vektor pASK-IBA3 kloniert und die Sequenz des resultierenden Plasmids durch Sequenzierung überprüft. Nach Überproduktion in *E. coli* und Reinigung des Proteins zeigte eine Silberfärbung und eine Immunofärbung nach SDS-PAGE, dass MM0635 in reinem Zustand isoliert werden konnte (Abbildung 42).

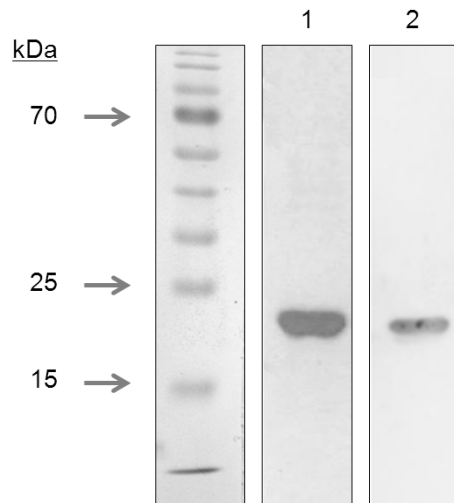


Abbildung 42: SDS-PAGE-Analyse von heterolog produziertem MM0635. (1) Silberfärbung nach SDS-PAGE (12,5 %). (2) Nachweis des Strep-Tags von MM0635 durch Antikörperfärbung. Aufgetragen wurde jeweils 2 µg Protein. Als Marker diente der vorgefärbte Proteinmarker. Von oben nach unten wiesen die Banden des Markers folgende Molekulargewichte auf: 170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa.

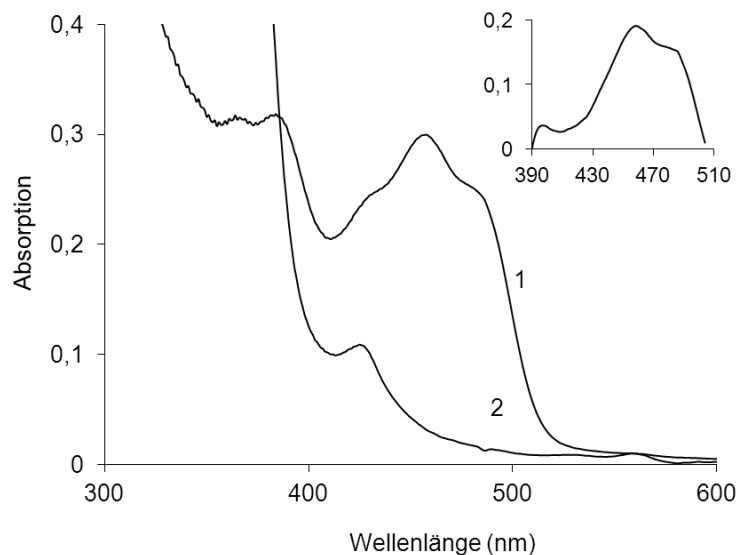


Abbildung 43: UV/Vis-Spektrum von MM0635. (1) Gezeigt ist das Protein ($1,4 \text{ mg ml}^{-1}$) im oxidierten Zustand, (2) und nach Reduktion durch einen Überschuss an Natriumdithionit. Das Differenzspektrum des oxidierten minus reduzierten Zustands ist als Einschub dargestellt.

Das Protein MM0635 war gelb gefärbt und wies ein für Flavin-haltige Enzyme typisches Absorptionsspektrum auf. Abbildung 43 zeigt das UV/Vis-Spektrum von MM0635 mit Maxima bei 480, 457, 430, 379 und 464 nm. Ein Vergleich zeigte, dass die Maxima von MM0634 und MM0635 sehr ähnlich waren. Wenn das Protein durch die Zugabe von Natriumdithionit reduziert wurde, war die Absorption im Bereich von 300 bis 600 nm bis auf ein Maximum bei 430 nm nicht mehr zu erkennen. Die Rückoxidation durch Oxidationsmittel war möglich, was ein Kennzeichen für redoxaktive Enzyme ist.

Die chemische Untersuchung des Proteins ergab, dass kein Eisen oder Schwefel gebunden war. Die HPLC-Analyse des Flavinkofaktors von MM0635 in Abbildung 44 zeigt die Elution nach 18 min, zu dem gleichen Zeitpunkt wie das FMN des Standards. MM0635 bindet demnach FMN; die Quantifizierung ergab einen Wert von $0,6 \pm 0,4$ FMN pro Monomer.

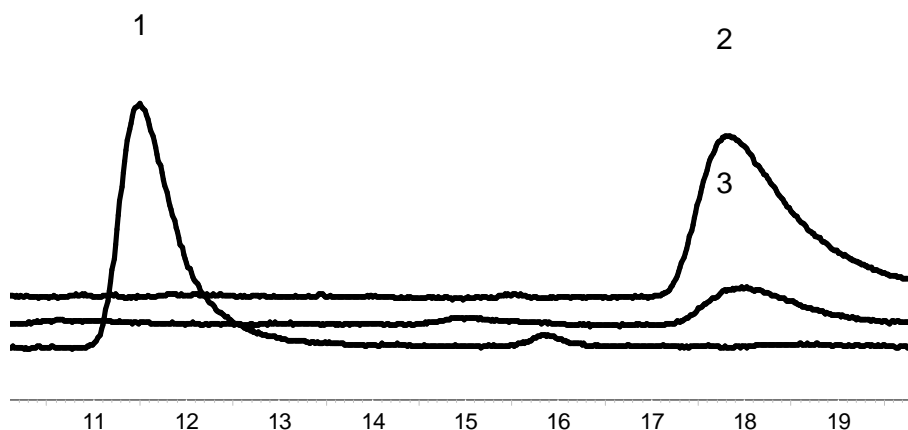


Abbildung 44: HPLC-Analyse der prosthetischen Gruppe von MM0635. (1) Elutionsprofil von FAD; (2) Elutionsprofil von FMN; (3) Elutionsprofil der Flavinpräparation von MM0635. Die X-Achse zeigt die Elutionszeit in Minuten, die Y-Achse zeigt die relative Absorption bei 436 nm.

Das zu MM0635 homologe Protein aus *A. fulgidus* konnte im Zellextrakt reduziert werden, wenn CO als Elektronendonator zugegeben wurde (59). Die Reaktion ließ sich durch Ferredoxin-Zugabe beschleunigen, was bedeutet, dass Ferredoxin als Elektronendonator für AfpA aus *A. fulgidus* fungiert. Ferredoxin wird von der CO-Dehydrogenase des Zellextraktes reduziert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Ferredoxin aus *C. pasteurianum*, reduziert durch die CO-Dehydrogenase aus *Mta. thermoacetica*, das Protein MM0635 mit hohen Raten reduzieren kann. Abbildung 45 (A) zeigt die Reduktion von MM0635, gestartet durch die Zugabe von Ferredoxin. Die abgebildete Reaktion begann langsam, und führte erst nach etwa drei

Minuten zu einem linearen Verlauf. Dieser Reaktionsverlauf ist typisch für die CO-Dehydrogenase, wenn durch die Zugabe des aeroben Ferredoxins geringe Mengen an Sauerstoff in den Testansatz gelangen.

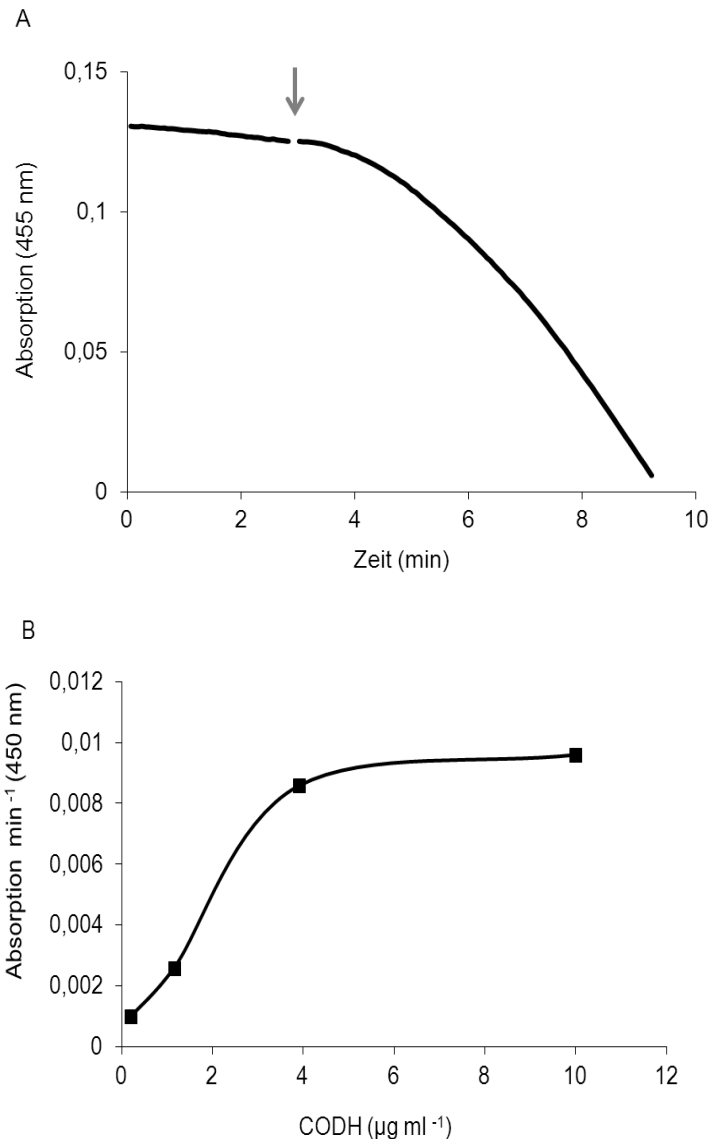


Abbildung 45: Reduktion von MM0635 durch Ferredoxin. (A) Darstellung der Reduktion von MM0635 anhand der Absorption der prosthetischen Gruppe FMN. Zu Beginn der Reaktion enthielt der Ansatz CO, CO-Dehydrogenase ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) und MM0635 ($0,4 \text{ mg ml}^{-1}$). Der Pfeil kennzeichnet die Zugabe von Ferredoxin aus *C. pasteurianum* ($12 \mu\text{g ml}^{-1}$). (B) Abhängigkeit der Reduktion von MM0635 von der Konzentration der CO-Dehydrogenase. Der Ansatz enthielt MM0635 ($0,35 \text{ mg ml}^{-1}$), Ferredoxin von *C. pasteurianum* ($6 \mu\text{g ml}^{-1}$), sowie steigende Konzentrationen an CO-Dehydrogenase (0 bis $10 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Die CO-Dehydrogenase erreicht erst dann ihre volle Aktivität, wenn der Sauerstoff reduziert wurde. Wenn eine der Komponenten der Elektronentransportkette fehlte, lief

die Reaktion nicht ab. Das in den Reaktionspuffer befindliche DTE (5 mM) konnte den Flavinkofaktor nur in geringen Raten von maximal $0,001 \text{ Absorption min}^{-1}$ reduzieren. Die Reduktionsrate des Flavins durch die Elektronentransportkette war von den eingesetzten Mengen der CO-Dehydrogenase und Ferredoxin abhängig. Da das Protein MM0635 als terminaler Akzeptor fungierte, stellt die abgebildete Reaktion nur eine Halbreaktion von MM0635 dar, die Reduktion des Flavins. Da in dieser Arbeit kein Elektronenakzeptor für MM0635 identifiziert werden konnte, wurde die Oxidation von MM0635 nicht analysiert. Abbildung 45 (B) zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der zugegebenen Menge an CO-Dehydrogenase. Rubredoxin aus *C. acetobutylicum* und Desulfiredoxin aus *Ms. mazei* (Kapitel 3.2.2) konnten das Ferredoxin nicht ersetzen. Als alternativer Elektronendonator wurde auch reduziertes F_{420} untersucht, das keine Elektronen an MM0635 abgeben konnte. Oxidiertes F_{420} konnte auch nicht als Elektronenakzeptor fungieren. Mit NADH und NADPH zeigte sich ebenfalls keine Aktivität, was nicht verwundert, da diese Kofaktoren in dem Metabolismus von *Ms. mazei* nur eine Nebenrolle spielen.

Kalyuzhnaya *et al.* (2005) haben gezeigt, dass AfpA-Proteine aus den gram-negativen methyloptrophen Organismen *Methylococcus capsulatus* und *Methylobacillus flagellatus* eine Dihydromethanopterin (H_2MPT)-Reduktase-Aktivität (DmrA) ausübten, und so den letzten Schritt der Biosynthese von Tetrahydromethanopterin (H_4MPT) katalysieren (102). Die Aktivität wurde nicht in einem Test mit gereinigtem Enzym demonstriert, sondern mit Hilfe einer Mutante von *Methylobacterium extorquens. Mea. extorquens* selbst besitzt kein AfpA. In der Mutante war das *dmrA*-Gen deletiert. Der Phänotyp der *dmrA*-Mutante konnte durch *in trans* eingebrachtes AfpA von *Mca. capsulatus* und *Mfl. flagellatus* aufgehoben werden, das heißt AfpA übernimmt die Dihydromethanopterin-Reduktase-Aktivität von DmrA.

Es lag nahe, diese Reaktion auch mit MM0635 zu testen. Ein Enzymtest mit aufgereinigtem MM0635 und Dihydromethanopterin als Substrat konnte allerdings nicht durchgeführt werden, da die Substanz nicht kommerziell erwerblich ist. Bei den Proteobakterien verwenden nur die gram-negativen methyloptrophen Bakterien Methanopterin (106). Die übrigen Proteobakterien verwenden statt dessen Folsäure. Daher wurde in einem Enzymtest untersucht, ob Dihydrofolat als Elektronenakzeptor für eine Elektronentransportkette aus NADPH, Ferredoxin:NADP⁺-Oxidoreduktase, Ferredoxin aus *C. pasteurianum* und MM0635 fungieren konnte. In diesem Versuch wurde jedoch keine Aktivität gefunden.

3.2.8 Untersuchungen zum Protein MM0636

3.2.8.1 Sequenzvergleich von MM0636

Das Gen *mm0636* ist der letzte funktionale offene Leseraster des Genclusters. Das Gen kodiert für ein 19,6 kDa großes Protein, das 82 % Sequenzübereinstimmung mit dem homologen Protein aus *Ms. acetivorans* und 73 % mit dem aus *Ms. barkeri* aufweist. Wie das Alignment in Abbildung 46 zeigt, sind die methanogenen Proteine einem Rubrerythrin aus *D. vulgaris* ähnlich. Das Rubrerythrin besitzt ein Zwei-Eisen-Zentrum, das als Ferritin-ähnlich bezeichnet wird (9). Wie mit Hilfe der Kristallstruktur des Rubrerythrin aus *D. vulgaris* bestätigt wurde, werden die zwei Eisenatome durch vier Glutaminsäuren und ein Histidin gebunden (54). Bei allen in Abbildung 46 verglichenen Aminosäuren waren diese 4 Glutaminsäuren und das Histidin konserviert. Rubrerythrine besitzen neben dem Ferritin-ähnlichen Zentrum ein zweites Eisenzentrum vom Rubredoxintyp $[\text{Fe}(\text{SCys})_4]$. Die vier erforderlichen Cysteine fanden sich in der Sequenz von MM0636 und den homologen Proteinen aus *Ms. acetivorans* und *Ms. barkeri* nicht wieder. Da das C-terminale $[\text{Fe}(\text{SCys})_4]$ -Zentrum hier nicht vorhanden ist, handelt es sich bei MM0636 also nicht um ein Rubrerythrin.

Eine Suche in der NCBI-Proteindatenbank lieferte zahlreiche Proteine, die ebenfalls Rubrerythrin-ähnlich sind und ein Zwei-Eisen-Zentrum als einzige prosthetische Gruppe besitzen. Die Proteinfamilie, zu der MM0636 gehört, ist also weit verbreitet, die Funktion ist jedoch nicht bekannt. Das einzige beschriebene Protein dieser Familie stammt aus dem aeroben Archaeon *Sulfolobus tokodaii* und wurde von den Entdeckern als Sulerythrin bezeichnet (197).

3.2.8.2 Charakterisierung des rekombinanten Proteins MM0636

Die kodierende Region von MM0636 wurde in den Vektor pASK-IBA3 kloniert und der resultierende Expressionsvektor durch Sequenzierung überprüft. Das Protein wurde unter Sauerstoffausschluss in *E. coli* produziert, anaerob gereinigt, rekonstituiert (Kapitel 2.5.7.1) und mit PD-10 Gelfiltrationssäulen entsalzt. Das auf diese Weise präparierte Protein wurde mit einer Silberfärbung und einem Western-Blot nach SDS-PAGE analysiert. Abbildung 47 zeigt, dass MM0636 in reinem Zustand isoliert werden konnte. Das gereinigte Protein war rot gefärbt und das UV/Vis-Spektrum (Abbildung 48) zeigte eine breite Absorption von 410 bis 650 nm und einem Maximum bei 468 nm. Diese Absorption war ähnlich zu dem Sulerythrin aus *S. tokodaii* und zu einen

D. vulgaris Rubrerythrin, dessen [Fe(SCys)₄]-Zentrum deletiert wurde (83, 197). Daher ist es wahrscheinlich, dass MM0636 ein Zwei-Eisen-Zentrum koordiniert.

MM0636	1	MESAYQNTVDEVRNLKG--IEEALALAIER█KEAKDFYMQQAAMMEN---PKFKELYEHLAGE█VKHLGYLEEYRDKKEL	75
MA3742	1	MKSAYKETIEEVRNLKG--IEEAIALAI DR█KEAREFYLQQAGLMEN---PKFKELYEELAAE█MKHLGYLENYRDKKEL	75
ST2370	1	-----MKDLKGTKTAENLKQGFIG█SMANRRYLYFAKRADEEGYPEIAGLLRSIAEG█TAHAFGHLD FIRQGG	69
Mbur2379	1	MSC-----IKETETEKNLKAFAG█SQARNRYTYFASVARKAGYDQISAIFAETADN█KEHAKRLFKFL-EGGD	68
DVU3094	1	MKS-----LKGRTEKNILTAFAAG█SQARNRYNYFGGQAKKDG FVQISDIFAETADQ█REHAKRLFKFL-EGGD	68
MM0636	76	PAISTEVPSGQSFSPFDPARTKVGEITLGDAGILLAAMRH█RKSE-DFYSELAKKTED█NQRF---FQMLSRV█R█E█Y	151
MA3742	76	PEISTEVPSGQSFSPFDASRTKVGEITLGDAGILLAAMRH█RKSE-DFYSEMAKRVED█TQKKF---FEMLSRY█R█E█Y	151
ST2370	70	TDPATDKPIG-----TLEQMIESAIAAG█TYEWTQMYPGFAKVARE█GFPEVAEWFETLARA█K█S█A130	
Mbur2379	69	VEVTASFPAG-----VISSTRDNLEAAAAG█NYEHTTMYPEFAKIAES█GFLEIASVFRHIAVA█K█E█E	132
DVU3094	69	LEIVAAFPAG-----I IADTHANLIASAAG█HHEYTEMYP SFARIARE█GYEEIARVFASIAVA█E█F█E	132
MM0636	152	EIIDSYLENVTSFRMQT-----	168
MA3742	152	EVIDSYLEYITQF-----	164
ST2370	131	EKFQNVLKQLKGGT-----	144
Mbur2379	133	ERYLKLAANLDLEMVFRKDGTVAWR█CRN█CGYIHEGPAAPDR█PA█DHPMGYFEVKAENY	191
DVU3094	133	KRFLDFARNIKEGRVFLREQATKWR█CRN█CGYVHEGTGAPEL█PA█AHPKAHFELLGINW	191

Abbildung 46: Alignment der Aminosäuresequenzen von MM0636, dem homologen Protein aus *Ms. acetivorans*, Sulerythrin aus *Sulfolobus tokodaii* und zwei Rubrerythrinen aus *M. burtonii* und *D. vulgaris*. Die Cysteine der [Fe(SCys)₄]-Zentren sind schwarz hinterlegt. Konservierte Aminosäuren, die das Zwei-Eisen-Zentrum aufbauen, sind zusätzlich durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Dargestellt sind die folgenden Proteine: MM0636: *Ms. mazei*, Rubrerythrin-ähnlich (AAM30332); MA3742: *Ms. acetivorans*, Rubrerythrin-ähnlich (NP_618615); ST2370: *Sulfolobus tokodaii* str. 7, Sulerythrin (NP_378371); Mbur2379: *M. burtonii* DSM 6242, Rubrerythrin (YP_566981); DVU3094: *D. vulgaris* str. Hildenborough, Rubrerythrin (YP_012305).

Die chemische Eisenbestimmung ergab für MM0636 einen Wert von $0,7 \pm 0,4$ Eisenatomen pro Monomer. Dies bestätigte, dass das in *E. coli* produzierte Protein Eisenionen gebunden hatte. In dem Eisenzentrum von MM0636 sind wahrscheinlich zwei Eisenionen über eine Sauerstoffbrücke verbunden.

Rubrerythrine aus Sulfat-reduzierenden δ -Proteobakterien und Clostridien-Stämmen sind eingehend untersucht worden (50, 122, 129, 164). Es wurde gezeigt, dass sie eine Peroxidase-Aktivität mit Wasserstoffperoxid als Substrat und Rubredoxin als Elektronendonator ausüben. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob MM0636 mit Desulforedoxin aus *Ms. mazei* oder Rubredoxin aus *C. acetobutylicum* als Elektronendonator Wasserstoffperoxid zu Wasser reduzieren kann. In der Zelle würde das Protein so oxidativem Stress entgegenwirken und könnte das von der Superoxid-Reduktase MM0632 gebildete Wasserstoffperoxid entgiften. MM0636 zeigte in Enzymtest mit der Ferredoxin:NADP⁺-Oxidoreduktase oder der NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase sowie den kleinen Elektronentransfer-Proteinen Desulforedoxin oder Rubredoxin in den hier durchgeführten Tests keine Aktivität mit Wasserstoffperoxid oder Alkylperoxiden als Substrat. Auch auf Sauerstoff oder Superoxid konnten keine Elektronen übertragen werden. In Studien mit dem Rubrerythrin aus *P. furiosus* wurde gezeigt, dass das [Fe(SCys)₄]-Zentrum für die Peroxidase-Aktivität essentiell ist (199). Das stimmt mit den hier erzielten Ergebnissen zu MM0636, das auch kein [Fe(SCys)₄]-Zentrum besitzt, überein. Das Protein kann daher keine Peroxidase sein und die Funktion von MM0636 bleibt unbekannt.

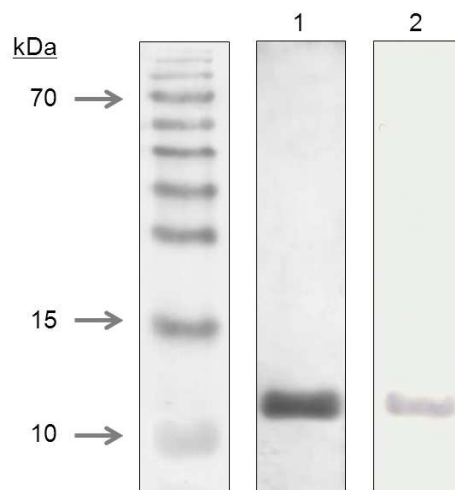


Abbildung 47: SDS-PAGE-Analyse von heterolog produziertem MM0636. (1) Silberfärbung nach SDS-PAGE (12,5 %). (2) Nachweis des Strep-Tags von MM0636 durch Antikörperfärbung. Aufgetragen wurde jeweils 2 μ g Protein. Als Marker diente der vorgefärbte Proteinmarker. Von oben nach unten wiesen die Banden des Markers folgende Molekulargewichte auf: 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa.

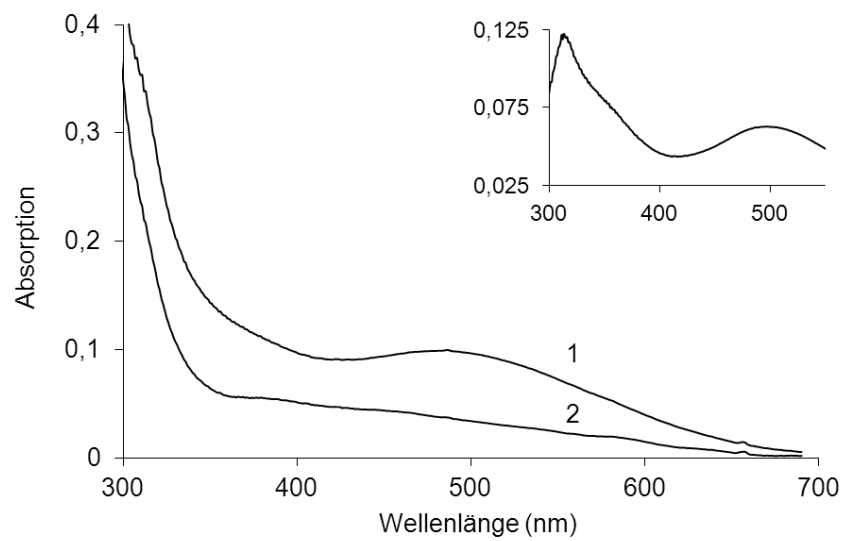


Abbildung 48: UV/Vis-Spektrum von MM0636 (2,2 mg ml⁻¹). (1) Absorption nach Oxidation des Proteins durch Luftsauerstoff; (2) Reduktion des Proteins durch DTE nach 30 Minuten. Das eingefügte Spektrum zeigt die Absorption des oxidierten minus reduzierten Zustandes.

4. Diskussion

4.1 Die Funktion von Methyltransferasen in *Ms. mazei*

Ms. mazei kann die Methylamine TMA, DMA und MMA als Substrate verwenden. Die Methylgruppen werden von spezifischen Methyltransferasen, MT1, auf Corrinoid-Proteine übertragen und von dort über eine zweite Transferase-Reaktion an Coenzym M weitergegeben. In *Ms. mazei* gibt es mehrere Isoformen der MT1-Enzyme und Corrinoid-Proteine, über deren Funktion in der Verstoffwechslung der Methylamine noch nichts bekannt war. Aus diesem Grund sollte eine chemische Analyse des Abbaus von TMA durchgeführt werden und über Transkriptionsstudien der kodierenden Regionen die Beteiligung der verschiedenen Isoenzyme an dem Abbau nachvollzogen werden.

Die Konzentration von TMA nahm wie erwartet während des Wachstums kontinuierlich ab. Schon früh in der exponentiellen Phase ließen sich DMA und MMA im Medium nachweisen. Die Menge an MMA, die von den Zellen freigesetzt wurde, erreichte in der späten exponentiellen Phase einen etwa sieben Mal höheren Wert als die Menge des DMAs im Medium. Am Ende der exponentiellen Phase war der TMA-Gehalt auf null gesunken und die Konzentration von DMA und MMA ging ebenfalls zurück, bis die Zwischenprodukte nicht mehr nachzuweisen waren. Der Versuch zeigte, dass TMA sukzessive demethyliert wird. Die für den Abbau von TMA, DMA und MMA in einer bestimmten Phase des Wachstums verantwortlichen Isoenzyme der MT1 und der Corrinoid-Proteine wurden über die Analyse des Transkriptionsprofils der korrespondierenden Gene detektiert. In der frühen exponentiellen Phase war das Operon der Gene *mttBC1/mtbBC1* vermehrt exprimiert, während es in der späten exponentiellen Phase nur gering exprimiert wurde. Das Operon der MMA- und DMA-spezifischen Enzyme, *mtmC1* und *mtbBC3*, war hingegen in der frühen Phase des Wachstums nur minimal, in der späten Phase stark exprimiert.

Aus diesen Daten lässt sich ein genaues Bild der Vorgänge in der Zelle rekonstruieren. In der ersten Wachstumsphase lag TMA im Überschuss im Medium vor und wurde über die Permease MttP1 in die Zellen aufgenommen. Die Permease ist mit MT1-Isoenzymen für TMA und DMA und deren Corrinoid-Proteinen in demselben Operon kodiert (*mttBC1/mtbBC1*). Die Methyltransferase MttBC1 demethyliert TMA und bildet DMA, das partiell aus der Zelle heraus transportiert wurde, während die DMA-abhängige Methyltransferase MtbBC1 das intrazelluläre DMA in MMA umsetzt. Die chemische Produktanalyse hatte gezeigt, dass das gebildete MMA in großen Mengen

in das Medium abgegeben wurde. Die MMA-spezifischen Methyltransferasen wurden also nicht benötigt und dementsprechend waren ihre Gene reguliert. Das Operon *mtmBC1* zeigte nur eine moderate Transkriptionsrate und die mRNA von *mtmBC2* war sogar nur in sehr geringer Kopienzahl vorhanden. Sobald TMA konsumiert war, trat eine Veränderung in dem Transkriptionsprofil der Gene der Methyltransferasen ein. Offensichtlich wurde die Expression des *mttBC1/mtbBC1*-Operons nahezu eingestellt, sobald die Substrate der Enzyme verbraucht waren. Nun kam dem *mtbCB3*-Operon eine wichtige Rolle zu, das in der zweiten Wachstumsphase eine stark erhöhte Expressionsrate aufwies. Die in diesem Operon kodierte Permease MtbP ist wahrscheinlich für den Transport des extrazellulären DMA in die Zelle verantwortlich, das nachfolgend zu MMA umgesetzt wurde. Dieser Prozess erklärt das Verschwinden von DMA aus dem Medium. In der späten Wachstumsphase war zudem das *mtmBC1*-Operon stark exprimiert, wo die für den Abbau von MMA zuständigen Enzyme kodiert sind. Auch in diesem Operon ist eine Permease kodiert, die höchst wahrscheinlich für den Transport des MMA aus dem Medium verantwortlich ist und die Abnahme der Verbindung in der letzten Phase des Wachstums bewirkte.

Ms. mazei kann sich der Verfügbarkeit von TMA anpassen und baut bevorzugt TMA und DMA ab, während MMA erst verstoffwechselt wird, wenn die übrigen Methylamine verbraucht sind. Das gebildete MMA wird primär aus der Zelle heraustransportiert und erst dann verstoffwechselt, wenn die Zelle darauf angewiesen ist. Der sofortige Abbau von TMA über das Zwischenprodukt MMA hinaus wird von *Ms. mazei* wahrscheinlich verzögert, da die Bildung von Ammonium in großen Mengen die Folge wäre. Ammonium ist in hohen Konzentrationen toxisch und könnte das Wachstum von *Ms. mazei* negativ beeinflussen. Der Organismus vermeidet daher die Demethylierung von MMA und exprimiert die für MMA zuständigen Gene erst dann, wenn kein TMA mehr vorhanden ist.

Die Gene der Isoenzyme für die TMA- und DMA-Verwertung, *mtbC2*, *mttB2*, *mttC2*, *mtbC2* und *mttC2*, und *mtmBC2* für die MMA-Verwertung zeigten nur geringe Transkriptionsraten und keine differenzierte Expression in Abhängigkeit von der Wachstumsphase. Demnach haben die Enzyme MttBC2 und MtbBC2 keine oder nur eine untergeordnete Funktion beim Wachstum mit TMA. Eventuell sind die Isoenzyme unter noch nicht bekannten Wachstumsbedingungen von Bedeutung. Vergleichbares wurde von Veit *et al.* (2006) durch eine Genom-weite Analyse des Transkriptionsmusters von *Ms. mazei* beim Wachstum mit TMA und Methanol für die Expression des Operons *mtmBC2* gefunden (195). Das Operon *mtmBC2* war ausschließlich unter Stickstoff-limitierten Bedingungen vermehrt exprimiert, wenn Methanol als Substrat verwendet wurde. Dieses Ergebnis stimmt mit den hier erzielten

überein, wo keine Regulation von *mtmBC2* in Abhängigkeit von der Wachstumsphase mit TMA als Substrat gefunden wurde.

In *Ms. barkeri* wurden Experimente durchgeführt, die mit dem hier erstellten Transkriptionsmuster des Operons *mttBC1/mtbBC1* in Einklang zu bringen sind (153). Das Transkript des gemeinsamen Operons von *mttBC1* und *mtbBC1* konnte über Northern-Blot-Analysen nur dann nachgewiesen werden, wenn TMA in dem Medium enthalten war. Bei Wachstum von *Ms. barkeri* mit MMA oder Methanol fand keine Transkription des Operon statt. Dies bestätigt die in dieser Arbeit gefundene Abhängigkeit der Expression von *mttBC1/mtbBC1* von der Verfügbarkeit von TMA.

In unserer Arbeitsgruppe wurde eine Genom-weite Analyse der differentiellen Genexpression in *Ms. mazei* bei Wachstum mit TMA im Vergleich zum Wachstum mit Methanol durchgeführt (111). Insgesamt wurden bei einem Vergleich von Zellen, die TMA verwendeten, mit Zellen, die Methanol als Substrat nutzten, 72 Gene identifiziert, die entweder erhöhte oder erniedrigte relative mRNA-Mengen aufwiesen. Zu den stark regulierten Genen gehörten auch die Gene *mtt*, *mtb* und *mtm*, die das Methylamin-spezifische Methyltransferase-System kodieren. Das Transkript des Operons *mttBC1/mtbBC1* war in Zellen, die TMA als Substrat verwendeten, etwa 40 Mal stärker exprimiert als in Zellen, die mit Methanol wuchsen. Andere Transkripte für Methylamin-abhängige Methyltransferasen (*mtmBC1*, *mtmBC2*, *mttBC2*, *mtbBC2*, und *mtbB3*) wurden auch in TMA-gewachsenen Zellen vermehrt detektiert, allerdings nur um einen Faktor von 2 bis 10. Die hohe Expressionsrate des Operons *mttBC1/mtbBC1* in der Genom-weiten Transkriptionsanalyse passt zu den hier mittels qRT-PCR gewonnenen Daten, die in der frühen und mittleren exponentiellen Phase ebenfalls eine hohe Transkriptionsrate für das Operon zeigten. Das Transkript des Operons *mttBC2/mtbBC2* war hingegen in der qRT-PCR-Analyse kaum zu detektieren, während es in der Genom-weiten Transkriptionsanalyse bei dem Vergleich der TMA- mit Methanol-gewachsenen Zellen ein Faktor von 2,5 bestimmt wurde. Die Gene der Isoenzyme sind sehr ähnlich und daher kann es bei der Microarray-Analyse leicht zu Kreuzhybridisierungen kommen, die die Ergebnisse verfälschen. Aus diesem Grund sind die mittels qRT-PCR gewonnenen Daten sehr viel genauer als die Daten der Genom-weiten Transkriptionsanalyse.

Methanol wird von vielen *Methanosarcina*-Stämmen sehr ähnlich wie die Methylamine metabolisiert. Die Methylgruppe wird von zwei Methanol-abhängigen MT1-Enzymen auf ein spezifisches Corrinoid-Protein übertragen und von einer zweiten Methyltransferase, MT2, in den zentralen Stoffwechselweg der Methanogenen eingeschleust. Die Methanol-spezifischen Enzyme MT1 und das Corrinoid-Protein sind

wie die TMA-spezifischen Enzyme in einem Operon organisiert und in drei Kopien vorhanden (*mtaBC1*, *mtaBC2* und *mtaBC3*), die in zahlreichen *Methanosarcina*-Stämmen konserviert sind (160).

Durch Reporter-gen-Experimente wurde bei *Ms. acetivorans* eine differenzierte Expression der Methanol-spezifischen Methyltransferase-Gene gefunden (26). Das Operon *mtaBC1* wird nur während des exponentiellen Wachstums transkribiert, während das Operons *mtaBC2* in der stationären Phase von Bedeutung ist. Das Operon *mtaBC3* war bei Wachstum mit MMA und Acetat vermehrt exprimiert, die Isoenzyme könnte also eine Rolle beim Wechsel der Substrate spielen.

Die zweite Methyltransferase A, MT2, wird in *Ms. mazei* und *Ms. acetivorans* von zwei homologen Genen kodiert (*mtaA1* und *mtaA2*). Das Isoenzym MtaA1 scheint das primäre MT2-Protein zu sein, denn während das Gen *mtaA1* für das Wachstum von *Ms. acetivorans* auf Methanol essentiell ist, zeigt die Deletion von *mtaA2* in diesem Organismus keinen Phänotyp (25). In *Ms. barkeri* wurde eine Kreuzreaktivität der MT2-Enzyme festgestellt. Für die Methyltransferase MtaA konnte gezeigt werden, dass das Enzym nicht nur als Methylgruppenüberträger für die Methanol-spezifischen Corrinoid-Proteine verantwortlich ist, sondern auch die Transfer-Reaktion mit TMA, aber nicht mit DMA oder MMA als Substrat katalysieren kann (68).

In dem Genom von *Ms. mazei* sind neben den zwei Methanol-spezifischen und dem TMA-spezifischen MT2-Enzym (MM1439) noch weitere MT2-Enzyme kodiert (MM0505, MM1932). Über deren Funktionen ist noch nichts bekannt, daher könnten sie ein Ansatzpunkt weiterführender Forschung über Methyltransferasen aus *Ms. mazei* sein.

In dieser Arbeit wurden die verschiedenen Isoenzyme der Methyltransferasen und Corrinoid-Enzyme für TMA, DMA und MMA auf Transkriptionsebene mittels qRT-PCR untersucht. Das Ergebnis ließ sich mit den Daten, die durch die Produktanalyse bei Wachstum auf TMA gewonnen wurden, in Einklang bringen und ergab ein genaues Bild davon, wie in *Ms. mazei* TMA verwertet wird. Für einen Teil der Isoenzyme wurde nur eine geringe Transkriptionsrate ohne Regulation in Bezug auf Substrat und Wachstumsphase festgestellt, während bei anderen Isoenzymen ein differenziertes Muster der Expression festgestellt wurde. Diese Ergebnisse belegen eindeutig, welche Enzyme die Methyltransferase-Reaktionen in Abhängigkeit von der Wachstumsphase katalysieren

4.2 Untersuchung der Gene und Genprodukte des Operons *mmdx* – *mm0636*

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der biochemischen Analyse von mehreren Proteinen, die von dem Gen-Cluster *mmdx* – *mm0636* kodiert werden. Ein herausragendes Merkmal dieser Proteine ist die ungewöhnliche Häufung von prosthetischen Gruppen. Jedes der Proteine hat eine unterschiedliche Zusammensetzung an verschiedenen prosthetischen Gruppen wie Häm-Gruppen, Flavinen, Eisen-Schwefel-Clustern, und ein- oder zweikernigen Eisenzentren. Während Cytochrome wie MM0633 und Flavoproteine wie MM0634 und MM0635 typischerweise in dem Elektronentransport involviert sind, zeigen MM0632 und MM0636 mit ihren einkernigen Eisenzentren Ähnlichkeiten zu Proteinen, die Schutzfunktionen vor giftigen Sauerstoff-Verbindungen übernehmen.

Zu Beginn dieser Arbeit lagen zwei Theorien über die Funktion der Proteine vor. Die erste leitete aus den Proteinen, deren Aufgabe wahrscheinlich im Transfer von Elektronen liegt, eine Beteiligung am Energiestoffwechsel von *Ms. mazei* ab. Dafür sprach auch, dass das Cluster für das einzige Cytochrom *c* in *Ms. mazei* kodiert, das membrangebunden ist und wahrscheinlich mit dem Phenazinpool in Verbindung steht. Die Atmungskette von *Ms. mazei* kann H_2 , $F_{420}H_2$ und reduziertes Ferredoxin als Elektronendonatoren verwenden (57). Während die Enzymkomponenten, die H_2 und $F_{420}H_2$ oxidieren, gut untersucht sind, besteht noch immer Unklarheit darüber, wie die Elektronen von reduziertem Ferredoxin in die Atmungskette gelangen. Zurzeit wird in mehreren Laboratorien in Deutschland und den USA an diesem Thema gearbeitet. Erst kurz vor der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit sind Ergebnisse, die mit dieser Frage in Zusammenhang stehen, veröffentlicht worden (19, 125, 200, 201).

Die zweite Theorie weist den Proteinen eine Funktion in der Umsetzung von Sauerstoffverbindungen zu. Vergleiche der Aminosäuresequenzen einiger Proteine, darunter MM0632, zeigten Ähnlichkeiten zu einem Enzymsystem aus *Archaea* und Bakterien, das ein effektives System zur Eliminierung von toxischen Sauerstoff-Verbindungen bildet. In diesem Zusammenhang sind zu den homologen Proteinen von MMDx – MM0636 aus *Ms. thermophila* und *Ms. acetivorans* einige Publikationen von der Arbeitsgruppe Ferry (Pennsylvania State University, University Park, USA) erschienen (8, 15, 52, 59, 120, 123, 207). Trotz der Fülle an Arbeiten lässt sich keine eindeutige Schlussfolgerung ziehen, welche Funktion den Proteinen in methanogenen *Archaea* zukommt und welche Aktivitäten sie *in vivo* ausüben.

Zeil war es, die Genprodukte des Operons *mmdx – mm0636* zu charakterisieren und ihre physiologische Funktion zu untersuchen. Insgesamt wurden sieben Gene (*mmdx* und *mm0631* bis *mm0636*) erfolgreich in Expressionsvektoren kloniert und die entsprechenden Proteine in *E. coli* produziert. Die Proteine wurden gereinigt und die unterschiedlichen prosthetischen Gruppen durch chemische Analysen, UV/Vis-Spektroskopie und Enzymtests analysiert. Im Folgenden wird zunächst auf die Experimente zur Operon-Struktur und Regulation eingegangen, bevor die Ergebnisse zur Untersuchung der Proteine diskutiert werden. Die untersuchten Proteine werden hierbei zu thematischen Gruppen zusammengefasst.

4.2.1 Untersuchung der Struktur und Regulation des Operons

Die Frage, ob das Gen-Cluster *mmdx – mm0636* ein Operon bildet, ist bedeutend für die Aufklärung der Funktion der Genprodukte. In Prokaryonten sind benachbarte Gene, deren korrespondierende Proteine eine gemeinsame Funktion ausüben, häufig in einem Operon organisiert, und ermöglichen so eine effektive und koordinierte Expression.

In dieser Arbeit sollte unter anderem durch die Analyse von mRNA gezeigt werden, dass die Gene *mmdx – mm0636* in einer zusammenhängenden Transkriptionseinheit exprimiert werden. Zu diesem Zweck wurde cDNA generiert und PCR-Reaktionen durchgeführt. Die Untersuchung konnte eine polycistronische mRNA von *mm0629 – mm0636* nachweisen, was bedeutet, dass die Gene in einem einzigen Operon vorliegen. Für die kleinen Gene *mm0637 – mm0638* konnte nicht nachgewiesen werden, dass sie Teil des Operons sind. Die Gene sind degradierte Produkte eines Vorgängergens und in *Ms. mazei* wahrscheinlich nicht funktional. Im Zuge der Evolution von *Ms. mazei* kam es wahrscheinlich zu Baseninsertionen und Deletionen, die zur Unterbrechung des Leserahmens führten. Diese Mutationen hatten jedoch offensichtlich keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von *Ms. mazei* und es kann daher geschlossen werden, dass das ursprüngliche vollständige Gen keine essentielle Funktion ausübte. Das oben beschriebene Ergebnis für *Ms. mazei* bestätigte Experimente mit *Ms. acetivorans*, wo die homologen Gene zu *mmdx – mm0636* ebenfalls ein einziges Operon bilden (123).

Nach Analyse der Operonstruktur wurde die Regulation der Transkription mittels qRT-PCR untersucht. Die relative mRNA-Menge des Operons wurde nach einem Sauerstoffschock der Zellen bestimmt und mit der einer unbehandelten Kultur verglichen. Mit dieser Vorgehensweise wurde gezeigt, dass die Gene *mmdx – mm0636* nach Sauerstoffkontakt der Zellen nicht vermehrt transkribiert werden. In dem Genom von *Ms. mazei* sind eine Superoxid-Dismutase (*mm2423*) und zwei Katalasen kodiert

(*mm1959*, *mm2557*). Homologe Proteine von *Ms. barkeri* sind in der Literatur beschrieben, daher ist es wahrscheinlich, dass die Superoxid-Dismutase und die Katalasen in *Ms. mazei* funktional sind. Zur Kontrolle wurde auch die relative Transkriptions-Rate dieser Gene bestimmt. Nach Inkubation der Zellen mit Sauerstoff wurden die Gene der Superoxid-Dismutase und der Katalasen, wie die Gene *mmdx* – *mm0636*, nicht verstärkt exprimiert. Die Transkriptionshäufigkeit des Operons *mmdx* – *mm0636* lag während des Wachstums auf TMA etwa auf dem Level der Transkription des *gap*-Gens, das für die Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase kodiert. Das Transkriptionslevel des zweiten Kontrollgens der qRT-PCR, *Isu*, das für das Protein L21e der 50S ribosomalen Untereinheit kodiert, war etwa drei Mal höher als das des *gap*-Gens. Die Gene *gap* und *Isu* sind essentiell für den Organismus und werden daher als konstitutiv exprimierte Zentralgene in *Ms. mazei* angesehen. Dass die mRNA Konzentration des Gens *Isu* höher war als das von *gap*, ist nicht verwunderlich, da die Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase, ein Enzym der Glykolyse, in *Ms. mazei* wahrscheinlich nicht so bedeutend ist, wie das ribosomale Enzym Protein L21e. Die Transkriptmenge der Superoxid-Dismutasen-Gene und einer Katalase waren um den Faktor 10 geringer im Vergleich mit dem Kontrollgen *gap*. Die zweite Katalase wurde sogar um den Faktor 100 geringer exprimiert. Die Transkriptionsanalyse der Kontroll-Gene lässt den Schluss zu, dass in *Ms. mazei* die Gene von Proteinen, die die Zelle vor Sauerstoff schützen, durch ihr Substrat nicht induziert werden. Eventuell sind solche Gene konstitutiv exprimiert. *Ms. mazei* gilt als anaerober Organismus, der in der Natur häufig in Habitaten mit oxisch-anoxischen Grenzflächen vorkommt. Für eine solche Umgebung wäre es vorteilhaft, wenn Schutzenzyme gegen Sauerstoffverbindungen ständig in der Zelle verfügbar sind.

In zwei unabhängigen Microarray-Analysen mit *Ms. barkeri* wurden die Transkription in Abhängigkeit von Sauerstoffstress untersucht (173, 206). Hier wurde ebenfalls keine differenzierte Transkription der zu *mmdx-mm0636* homologen Gene gefunden. Die mRNA der Zellen wurde hier mit und ohne Inkubation mit Sauerstoff für 30 Minuten verglichen. Auch die Gene der Katalase und der beiden Superoxid-Dismutasen sind in *Ms. barkeri* nicht Sauerstoff-abhängig exprimiert.

In früheren Arbeiten wurde mittels Mikroarray-Analysen die Genexpression des *Ms. mazei*-Genoms bei Wachstum mit unterschiedlichen Substraten untersucht. Bei der Genom-weiten Transkriptionsanalyse zeigte sich, dass die mRNA der Gene des Bereichs von *mm0629* – *mm0638* bei Wachstum auf Acetat in größerer Menge in den Zellen vorhanden war, als bei dem Wachstum mit TMA oder Methanol (93). In einer Mikroarray-Analyse von *Ms. acetivorans* zeigte sich ein ähnliches Bild. Hier war das

Gen *ma3743*, das zu den Genen *mm0637* und *mm0638* homolog ist, bei Wachstum auf Acetat verstärkt exprimiert (124). Dies lässt auf eine Funktion der Proteine bei Wachstum mit Acetat schließen. In der Analyse des Transkriptionsmusters von *Ms. acetivorans* mit den Substraten Methanol und Acetat wurden vermehrt mRNA von Gene gefunden, die nicht näher charakterisiert sind, aber mit Stress funktional in Verbindung gebracht werden können. Bei Wachstum mit Acetat könnte Stress-Proteinen eine generelle Funktion zukommen. Eventuell bedeutet das langsame Wachstum mit Acetat im Vergleich zu Methanol eine Belastung, die die Hochregulation von mehreren Stressgenen bewirkt (124).

4.2.2 Bioinformatische Analyse der Proteine MM0629 und MM0630

Die Proteine MM0629 und MM0630 besitzen eine Zink-Finger-Domäne mit einem charakteristischen, Cystein-reichen Motiv, das bei beiden Proteinen fast identisch ist. (MM0629: CX₂CX₁₂CX₂CX₄CX₂₈CX₂C; MM0630: CX₂CX₁₂CX₂CX₄CX₂₉CX₂C). Zinkfingerproteine können Zinkionen über vier oder sechs Cysteine, aber auch über drei Cysteine und ein Histidin binden und üben in der Regel die Funktion von Transkriptionsfaktoren aus.

Die Proteine MM0629 und MM0630 kommen nur innerhalb der Gruppe der Methanarchaea vor. Die Präsenz von zwei Transkriptionsregulatoren am Beginn des Operons ist ein Hinweis darauf, dass das Operon einer Regulation unterworfen ist. Über die Art und Weise der Regulation ist derzeit nichts bekannt. Die Zinkfingerproteine MM0629 und MM0630 wurden in dieser Arbeit nicht produziert oder biochemisch analysiert.

4.2.3 Charakterisierung von MM0631

Das Protein MM0631 wurde erfolgreich in *E. coli* produziert und aufgereinigt. Eine SDS-PAGE und ein Western-Blot bestätigten, dass das Protein in reinem Zustand vorlag und das erwartete Molekulargewicht aufwies. Das UV/Vis-Spektrum des braun gefärbten Proteins zeigte Charakteristika, die typisch für Eisen-Schwefel-Zentren sind. Durch eine chemische Schwefel- und Eisenanalyse wurde bestätigt, dass das Protein Eisen und Schwefel bindet. Die Natur des Eisen-Schwefel-Clusters konnte mit den für dieses Protein angewandten Techniken nicht bestimmt werden. Eine Untersuchung des homologen Proteins aus *Ms. acetivorans*, MA3736, wurde im Jahr 2007 veröffentlicht, als die ersten Versuche zur Produktion von MM0631 vorlagen (123). In *Ms. acetivorans* bindet das Protein MA3736 ebenfalls ein Eisen-Schwefel-Cluster unbekannter Natur. Die Cysteine, die das Eisen-Schwefel-Cluster koordinieren, werden

von dem CXXC-Motiv zur Verfügung gestellt. In *Ms. acetivorans* bildet das Protein MA3736 ein Hexamer, wenn das Eisen-Schwefel-Cluster an das Protein gebunden ist, und ein Trimer, wenn es kein Eisen-Schwefel-Cluster enthält. Das bedeutet, dass ein Eisen-Schwefel-Cluster von zwei Trimeren koordiniert wird, die sich zu einem Hexamer zusammenschließen.

Wie in einem Insulintest nachgewiesen wurde, katalysiert das Protein MA3736 die Reduktion von Disulfiden (123). In dem Test konnte MA3736 Disulfidbrücken zwischen den Insulin-Polypeptidketten mit DTT als Elektronendonator reduzieren. Die Aktivität des Proteins wird von den Autoren mit 20 % der Aktivität des Thioredoxins aus *E. coli* angegeben. MA3736 war nur aktiv, wenn es anaerob präpariert und in einem anaeroben Test eingesetzt wurde, und wenn es mit EDTA vorbehandelt wurde. Das an das CXXC-Motiv gebundene Eisen-Schwefel-Cluster musste also zerstört werden, bevor MA3736 eine Disulfid-Reduktase Aktivität zeigte. Mit dem anaerob präpariert und EDTA-behandelten Protein MM0631 von *Ms. mazei* wurde der Insulintest ebenfalls anaerob durchgeführt. Hier konnte jedoch keine Aktivität detektiert werden. Mit dem Thioredoxin aus *E. coli* wurde die Funktionalität des Tests nachgewiesen. Daher kann als sicher gelten, dass MM0631 keine Disulfid-Reduktase-Aktivität besitzt.

Die Proteine MM0631 aus *Ms. mazei* und MA3736 aus *Ms. acetivorans* besitzen strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Protein AhpD aus *Mykobakterium tuberculosis*. AhpD ist eine Disulfid-Reduktase, die das katalytisch Zentrum der Peroxidase AhpC regeneriert. Neben der Katalase ist AhpC in *E. coli* das wichtigste Enzym zur Entgiftung von Wasserstoffperoxid und Alkyl-Peroxiden (174). Das aktive Zentrum von AhpC besteht aus einem redox-aktiven Cystein, das nach der Oxidation durch das Substrat mit der Thiolgruppe eines zweiten Cysteins eine Disulfidbrücke bildet. Die reaktiven Cysteine von AhpC werden durch einen Thiol/Disulfidaustausch mit AhpD regeneriert, das in *M. tuberculosis* wiederum durch die Dihydroliponamid-Dehydrogenase (DHLDH) und die Dihydroliponamid-Succinyltransferase (SucB) NADH-abhängig reduziert wird (35). Andere Organismen regenerieren AhpC auf einem anderen Weg. In Salmonellen katalysiert das Flavin-haltige Enzym AhpF die Reaktion mit NADH als Elektronendonator (159). *Pyrococcus horikishii* und Hefen machen von einer weiteren Möglichkeit zur Regeneration von AhpC Gebrauch, hier katalysiert Thioredoxin und die Thioredoxin-Reduktase diesen Schritt (41, 105).

MM0631 besitzt mit der Aminosäurefolge CXXC ein für Disulfid-Reduktasen typisches Motiv, das in homologen Proteinen aus anderen methanogenen *Archaea* konserviert ist. Die Disulfid-Reduktase-Aktivität des zu MM0631 homologen Proteins aus *Ms. acetivorans* wurde zum Anlass genommen, in dem Genom von *Ms. mazei* nach

Genen zu suchen, deren korrespondierende Proteine funktional mit einer Disulfid-Reduktase-Aktivität in Verbindung stehen.

Das Gen *mm0368* ist eine Kopie von *mm0631* mit einer zu 75 % identische Sequenz. Abgesehen von diesem Enzym gibt es noch vier weitere paraloge Enzyme mit einer Ähnlichkeit zwischen 30 % und 40 %. Das Genom von *Ms. mazei* kodiert demnach gleich mehrere Enzyme mit einem CXXC-Motiv, daher ist es wahrscheinlich, dass diese Proteine in dem Organismus eine wichtige Funktion ausüben. Bisher ist nicht bekannt, welche Enzyme in *Ms. mazei* ein redox-aktives Cystein-Motiv regenerieren können. In dem hier untersuchten Operon *mmdx – mm0636* ist außer MM0631 kein weiteres Enzym kodiert, das ein redox-aktives Cystein enthält, daher muss MM0631 mit einem Enzym oder Kofaktor außerhalb des Operons interagieren, falls das Cystein-Motiv *in vivo* redox-aktiv ist.

Eine Suche nach Proteinen, die in *Ms. mazei* die Regeneration der reaktiven Cysteine in MM0631 katalysieren könnten, zeigte, dass sich in dem Genom zwei Proteine kodiert sind, die ebenfalls über katalytisch aktive Cysteine verfügen, die Gluthation-Reduktase (MM0897) und die Dihydroliponamid-Dehydrogenase (MM3279). In *Ms. mazei* allerdings fehlen die Enzyme für die Gluthation-Biosynthese, so dass sich über die Funktion der Gluthation-Reduktase keine Aussage machen lässt. Über die Funktion der Dihydroliponamid-Dehydrogenase in *Archaea* ist nichts bekannt (13). Das Enzym könnte an der Regeneration von reaktiven Cysteinen in MM0631 oder anderen Proteinen in *Ms. mazei* beteiligt sein.

In dem Genom von *Ms. mazei* ist darüber hinaus eine Thioredoxin-Reduktase (*mm2353*) kodiert, und vier Gene, die als Thioredoxine annotiert sind (*mm0436*, *mm0706*, *mm2079*, *mm2354*). Zwei Gene sind als Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktasen annotiert, die allerdings bisher nur bei photosynthetisch aktiven Prokaryonten beschrieben wurden. Thioredoxine sind kleine Proteine, die ebenfalls ein redox-aktives CXXC-Motiv besitzen und über die Thioredoxin-Reduktase Kofaktor-abhängig regeneriert werden. Thioredoxine sind über alle drei Domänen des Lebens weit verbreitet und haben mehrere Funktionen. In Prokaryonten bilden sie Disulfid-Brücken in Proteinen und dienen als Elektronendonator für mehrere Proteine, darunter auch Peroxidasen (92, 105). Die Häufung von Thioredoxinen- und Thioredoxin-gekoppelten Enzymen in *Ms. mazei* macht die Funktionalität dieses Enzymsystems wahrscheinlich. Daher könnte auch MM0631 mit Thioredoxinen interagieren.

Wie zuvor bereits beschrieben wurde für das zu MM0631 homologe Enzym aus *Ms. acetivorans* demonstriert, dass das Eisen-Schwefel-Cluster von Cysteinen aus zwei Trimeren koordiniert wird (123). Die volle Aktivität kann nur von Enzymen

ausgeübt werden, deren Eisen-Schwefel-Cluster zerstört ist. Dieser Umstand macht eine regulatorische Funktion des Clusters möglich. Regulatorische Eisen-Schwefel-Cluster können als Sauerstoffdetektor fungieren. Das Protein FNR (Fumarat-Nitrat-Reduktase-Regulator) aus *E. coli* ist ein Transkriptionsregulator mit einem redoxsensitiven [4Fe-4S]-Cluster zwischen zwei FNR-Monomeren als molekularem Schalter. Unter Sauerstoffeinfluss zerfällt das [4Fe-4S]-Cluster zu einem [2Fe-2S]-Cluster, bis bei andauerndem Sauerstoffeinfluss apo-FNR entsteht. Durch den Zerfall des [4Fe-4S]-Clusters wird das Enzym deaktiviert (109, 185). Lessner und Ferry (2007) beschreiben, dass in MA3736 und MM0631 das Eisen-Schwefel-Cluster ebenfalls eine regulatorische Funktion ausüben könnte (123).

Glutaredoxine sind, analog zu Thioredoxinen, Thiol-Oxidoreduktasen mit zwei Cysteinen im aktiven Zentrum und Glutathion fungiert als Elektronendonator. Diese Peptide kommen, ebenso wie Thioredoxine, in zahlreichen Prokaryonten und Eukaryonten vor und werden auch im Menschen gefunden (166). Für einige Glutaredoxine wurde eine Rolle in der Abwehr von oxidativem Stress nachgewiesen, für andere primär eine Funktion in der Kontrolle der Redox-Homöostase gefunden. Das Glutaredoxin 5 aus Eukaryonten besitzt eine Funktion in der Synthese von Eisen-Schwefelclustern und der Häm-Biosynthese (166). Es handelt sich hierbei um solche Glutaredoxine, die in der Lage sind, ein labiles Eisen-Schwefel-Cluster zwischen zwei Monomeren aufzubauen. Solche Polypeptide können als Gerüst-Proteine effektiv Eisen-Schwefel-Zentren auf andere Proteine übertragen. Für MM0631 kann, da auch hier ein Eisen-Schwefel-Cluster zwischen zwei Monomeren vorliegt, eine solche Funktion angenommen werden (123). Substrate könnten MM0632 oder MM0634 sein. Als MM0631 und MM0632 ohne Eisen-Schwefel-Cluster zusammen inkubiert wurden, konnte jedoch keine Veränderung des Spektrums der Enzyme beobachtet werden (nicht gezeigt).

Das Protein MM0631 enthielt das Eisen-Schwefel-Cluster unabhängig davon, ob es aerob oder anaerob aufgereinigt wurde. Auch nach langer Inkubation des bräunlichen Proteins unter aeroben Bedingungen veränderte sich das UV/Vis-Spektrum nur geringfügig. Es ist also fraglich, ob es sich um ein sehr labiles Eisen-Schwefel-Cluster handelt, was bei den Thioredoxinen Voraussetzung für eine Beteiligung am Aufbau von Metallzentren in anderen Proteinen ist.

4.2.4 Die Funktion von Protein MM0632 als Superoxid-Reduktase im Stoffwechsel von *Ms. mazei*

Das Protein MM0632 sollte in dieser Arbeit gereinigt und analysiert werden. Das Interesse war zum einen durch die Tatsache begründet, dass bislang noch keine Superoxid-Reduktase aus methanogenen *Archaea* analysiert worden ist. Zum anderen wäre die Charakterisierung von MM0632 als Superoxid-Reduktase eine bedeutende Information für die Klärung der Frage, welche Funktion den Proteinen MMDx – MM0636 zukommt. MM0632 wurde erfolgreich in *E. coli* produziert und eine SDS-PAGE und ein Western-Blot zeigten das Protein in reiner Form und mit dem korrekten Molekulargewicht.

4.2.4.1 Analyse der Aminosäuresequenz und Identifizierung eines [4Fe-4S]-Clusters in MM0632

Superoxid-Reduktasen katalysieren im Unterschied zu Superoxid-Dismutasen die Reduktion von Superoxid mit einem Elektronendonator. Hinweise auf Superoxid-Reduktasen wurden erstmalig in anaeroben Sulfat-reduzierenden Bakterien aus der Gattung *Desulfovibrio* gefunden und die Aktivität zuerst in dem Archaeon *P. furiosus* nachgewiesen (100, 144). Inzwischen wurde eine Fülle an Enzymen aus unterschiedlichen Organismen intensiv untersucht und Kristallstrukturen aufgeklärt (117, 157). Bislang sind drei verschiedene Typen von Superoxid-Reduktasen in der Literatur beschrieben (Abbildung 49).

(I) Neelaredoxine besitzen ein einkerniges $[\text{Fe}(\text{NHis})_4(\text{SCys})]$ -Zentrum, das von vier Histidinen in äquatorialer Anordnung und einem Cystein ligiert wird (Abbildung 49 B, C). Abhängig von dem Redoxstatus des Metallzentrums dient eine Glutaminsäure als sechster Ligand.

(II) Desulfoferrodoxine besitzen ebenfalls das katalytische $[\text{Fe}(\text{NHis})_4(\text{SCys})]$ -Zentrum und zusätzlich ein $[\text{Fe}(\text{SCys})_4]$ -Zentrum, das von vier Cysteinen koordiniert wird (Abbildung 49 A, D).

(III) Eine dritte Klasse von Superoxid-Reduktasen wurde in *T. pallidum* gefunden. Die Proteine dieser Klasse sind homolog zu Desulfoferrodoxinen, wobei die konservierten Cysteine des $[\text{Fe}(\text{SCys})_4]$ -Zentrums fehlen und damit nur das $[\text{Fe}(\text{NHis})_4(\text{SCys})]$ -Zentrum vorhanden ist (171).

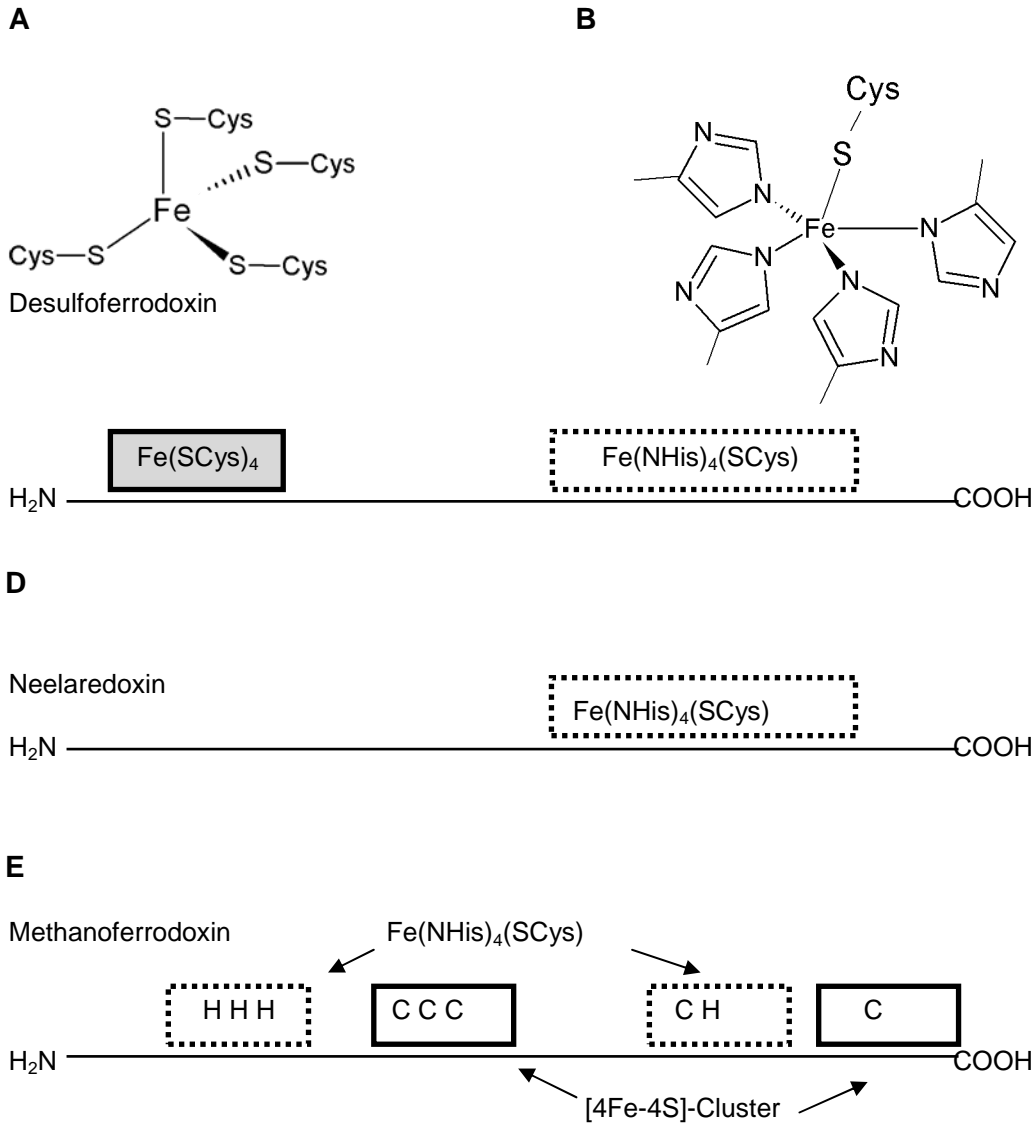


Abbildung 49: (A) $[\text{Fe}(\text{SCys})_4]$ -Zentrum; (B) $[\text{Fe}(\text{NHis})_4(\text{SCys})]$ -Zentrum; (C) Schematische Darstellung von Desulfoferrodoxin; (D) Neelaredoxin; (E) Methanoferrodoxin. Bei Desulfoferrodoxin und Neelaredoxin sind die Eisen-Zentren eingetragen. Bei Methanoferrodoxin sind die Aminosäuren eingezeichnet, die die Metallzentren koordinieren.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen hatte gezeigt, dass sich MM0632 in mehreren Punkten von anderen Superoxid-Reduktasen unterscheidet. Zum einen ist die Aminosäuresequenz von MM0632 etwas länger, als die Sequenz der meisten Neelaredoxine. Die Suche nach den für die Bindung des $[\text{Fe}(\text{SCys})_4]$ -Zentrums nötigen Cysteine ergab, dass diese in MM0632 nicht an der für Desulfoferrodoxine üblichen Position am N-Terminus des Proteins liegen. Das Alignment zeigte auch, dass in der Mitte von MM0632 ein Bereich eingeschoben ist, der sich in anderen

Desulfoferrodoxinen nicht wiederfindet (Kapitel 3.2.4.1). Auch der C-Terminus von MM0632 ist etwas länger als bei den Desulfoferrodoxinen. In dem inserierten Bereich befinden sich drei Cysteine in einem C(X)₇CXXC-Motiv. Die Verlängerung am C-Terminus enthält ein weiteres Cystein (Abbildung 49 E). Durch ESR-spektroskopische Untersuchungen und chemische Eisen-Schwefel-Bestimmungen wurde untersucht, ob die Cysteine in MM0632 eine prosthetische Gruppe binden. Nach Rekonstitution des Proteins mit Fe³⁺ und S²⁻ wies das Protein eine braune Färbung auf und zeigte ein breites Absorptionsspektrum, das dem von Eisen-Schwefel-Proteinen ähnelte. Eine Analyse des Proteins hat gezeigt, dass das rekonstituierte und gereinigte Enzym 4,5 ± 1,2 mol Säure-labilen Schwefel und 5,7 ± 0,4 mol nicht-Häm Eisen pro mol Protein bindet. Der Verteilung von Eisen- und Schwefelatomen pro Monomer machte ein vierkerniges Eisen-Schwefel-Cluster wahrscheinlich. Das Protein wurde in *E. coli* produziert, wobei das Nährmedium mit FeCl₃ und Na₂S supplementiert, und die Produktion und Reinigung des Proteins anaerob durchgeführt wurden. Unter diesen Bedingungen wurde auch ohne Rekonstitution braun gefärbtes MM0632 beobachtet. Wahrscheinlich war in diesen Präparationen ebenfalls ein [4Fe-4S]-Cluster gebunden. Die Präparationen ohne Rekonstitution waren allerdings nicht verlässlich von guter Qualität, daher wurde standardmäßig auf die Rekonstitution des Enzyms im Rohextrakt mit Eisen- und Schwefelionen zurückgegriffen. In Zusammenarbeit mit Katerina Dörner und Prof. Thorsten Friedrich (Universität Freiburg, Deutschland) wurde mittels ESR-Spektroskopie nachgewiesen, dass MM0632 ein *high-spin* [4Fe-4S]-Cluster besitzt. Das [4Fe-4S]-Cluster zeigte axiale Signale von g_{x,y} = 1,93 und g_z = 2,047. Neben dem [4Fe-4S]-Cluster wurde ein typisches Signal eines *high-spin* (S = 5/2) Fe³⁺-Zentrums bei g = 4,3 detektiert. Das Signal wurde dem [Fe(NHis)₄(SCys)]-Zentrum zugeordnet und wird auch bei anderen Neelaredoxinen gefunden. MM0632 ist somit die erste Superoxid-Reduktase mit einem [4Fe-4S]-Cluster neben einem [Fe(NHis)₄(SCys)]-Eisenzentrum und ist demzufolge Repräsentant einer neuen Klasse von Superoxid-Reduktasen. Die neu entdeckte Proteinklasse wurde in Analogie zu Desulfoferrodoxin als Methanoferrodoxin bezeichnet.

Homologe Bereiche zu dem Cystein-reichen C(X)₇CXXC-Motiv und einem weiteren Cystein am C-Terminus in MM0632 wurden in weiteren methanogenen *Archaea* in Proteinen von *M. burtonii* (YP_565539), *M. mahii* (YP_003542283) und *M. evestigatum* (YP_003727000) gefunden, was darauf hindeutet, dass diese Organismen ebenfalls ein Methanoferrodoxin besitzen.

Im Folgenden soll untersucht werden, warum Methanoferrodoxin sich bei diesen *Archaea* findet. Die drei Arten sind alle in die Familie *Methanosarcinaceae* einzuordnen. Die Familie *Methanosarcinaceae* gehört nach der Einteilung von

Anderson *et al.* (2009) zu der Gruppe III der Methanogenen (7). Zu der Gruppe I gehören *Methanobacteriales*, *Methanococcales* und *Methanopyrales*, die Gruppe II wird durch *Methanomicrobiales* gebildet. Gruppe I und II sind besonders durch hydrogenotrophes Wachstum gekennzeichnet. Gruppe III besitzt einen vornehmlich methylotrophen Stoffwechsel und enthält durch die entwicklungsgeschichtlich getrennte Evolution und den andersartigen Stoffwechsel charakteristische Enzyme, die bei den übrigen Gruppen nicht vorkommen, darunter auch die Cytochrome (7, 56).

Ms. mazei und die drei übrigen Arten mit Methanoferrodoxin unterscheiden sich in der optimalen Temperatur für ihr Wachstum. *Ms. mazei* und *M. mahii* wachsen bei 35 °C, während *M. evestigatum* bei 50 °C wächst und *M. burtonii* mit einem Optimum bei 23 °C psychophil ist. *Ms. mazei* ist der einzige Organismus dieser Gruppe, der neben methylierten C₁-Verbindungen auch Acetat oder H₂/CO₂ als Substrat verwerten kann. *M. burtonii*, *M. mahii* und *M. evestigatum* sind strikt methylotroph und wachsen ausschließlich mit Methanol und Methylaminen. Im Meer sind methylierte Verbindungen wie Methylamine reichlich vorhanden, und sie dienen vielen Sulfat-reduzierenden Bakterien nicht als Substrat (149). Molekularer Wasserstoff und Acetat hingegen werden von Sulfat-reduzierenden Prokaryonten mit größerer Effektivität genutzt als von methanogenen *Archaea*, daher hat sich bei den letztgenannten Organismen, die aus salinen Gewässern oder Meerwasser isoliert wurden, wahrscheinlich eine methylotrophe Wachstumsweise durchgesetzt (149, 186).

M. mahii und *M. evestigatum* sind halophile Organismen, die bei hohen Salzkonzentrationen von 2 M bzw. 4,3 M wachsen können (208, 97). *M. burtonii* hingegen ist nur moderat halophil (5). Das Protein Methanoferrodoxin kommt demnach vermehrt in halophilen Organismen vor. Diese Tatsache muss aber nicht verwundern, denn in der Familie *Methanosarcinaceae* befinden sich sehr viel mehr halophile und moderat halotolerante Arten als in vielen anderen Familien der methanogenen Gruppen I und II (69). Innerhalb der Familie *Methanosarcinaceae* mit insgesamt acht Gattungen gibt es mehrere Gattungen mit halophilen Arten, darunter *Methanohalobium*, *Methanohalophilus*, *Halomethanococcus* und *Methanosalsum*. Neben halophilen Organismen gibt es zahlreiche Vertreter, die aus Salzwasser isoliert wurden und Salz zum Wachstum benötigen, darunter *M. burtonii* und mehrere Arten der Gattung *Methanlobus* sowie *Methanosarcina siciliae* und *Ms. acetivorans* aus der Gattung *Methanosarcina* (5, 73, 147, 148, 183). Im Gegensatz dazu gibt es mehrere Arten, der Gattungen *Methanomethylovorans* und *Methanosarcina*, die aus Süßwasser isoliert wurden und weniger Salz benötigen. (167). Ob die Methanbildner in halophile Salzwasser- und Süßwasser-Methanarchaea unterteilt werden können, ist jedoch fraglich, da auch *Ms. mazei*, *Ms. thermophila* und *Ms. barkeri* Salzkonzentrationen von

etwa 0,8 M tolerieren, was im Bereich der Salzkonzentration von Meerwasser mit 0,6 M NaCl liegt (27, 155, 184). Dies zeigt, dass halotolerante und moderat halophile Organismen in der Familie der *Methanosarcinaceae* häufig anzutreffen sind. Daher kann aus dem Vorkommen von Methanoferrodoxin in den extrem-halophilen (*M. evestigatum*), halophilen (*M. mahii*), moderat halophilen (*M. burtonii*) und halotoleranten (*Ms. mazei*) Organismen keine besondere Funktion dieses Enzyms im Salzstoffwechsel abgeleitet werden.

4.2.4.2 Superoxid-Reduktase-Aktivität von Methanoferrodoxin

In dieser Arbeit wurde die Aktivität von MM0632 mit den bereits beschriebenen Aktivitätstests nachgewiesen (Kapitel 3.2.4.3) (127, 136, 163). In dem Cytochrom c-Test diente reduziertes Cytochrom c als Elektronendonator und Superoxid als Elektronenakzeptor. Der Test wurde ursprünglich für Superoxid-Dismutasen entwickelt (68). Methanoferrodoxin zeigte in dem Test eine hohe Aktivität von 14.000 U mg⁻¹. Diese Aktivität war vergleichbar mit der Aktivität der Superoxid-Reduktase von *A. fulgidus* (4000 U mg⁻¹) (100). Für die Superoxid-Reduktase von *C. acetobutylicum* und *Desulfoarculus baarsii* wurden spezifische Aktivitäten von 160 bzw. 53 U mg⁻¹ beschrieben (127, 163).

Superoxid-Dismutasen zeigen in dem Cytochrom c-Test in der Regel eine Aktivität von 2000 Units. Der Vergleich zeigte, dass Methanoferrodoxin ein effektives Protein zur Entgiftung von Superoxid ist. Der Test mit Cytochrom c kann jedoch nur bedingt zur Aktivitätsbestimmung von Superoxid-Reduktasen herangezogen werden, da Cytochrom c nicht der physiologische Elektronendonator ist.

In einem zweiten Enzymtest wurde Methanoferrodoxin durch Rubredoxin aus *C. acetobutylicum* reduziert. Der Vektor für die Produktion des Enzyms wurde von Oliver Riebe (Universität Rostock, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Bei *D. vulgaris* wurden zum ersten Mal gezeigt, dass Rubredoxin, ein kleines Protein mit einem einzigen einkernigen Eisenzentrum, in der Lage ist, Elektronen an die Superoxid-Reduktase abzugeben (49). Inzwischen wurde bei mehreren Organismen Rubredoxin als Elektronendonator der Superoxid-Reduktasen identifiziert (49, 82, 163, 165). Rubredoxin wird durch eine NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase reduziert. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um den nativen Elektronendonator für Rubredoxin, da in einigen Organismen die NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase zusammen mit der Superoxid-Reduktase und dem Rubredoxin in einem Operon kodiert ist. In dem Enzymtest wurde klar gezeigt, dass Methanoferrodoxin mit Rubredoxin aus *C. acetobutylicum* als Elektronendonator eine Superoxid-Reduktase-Aktivität besitzt.

Rubredoxin ist somit ein Elektronendonator für Methanoferrodoxin, analog zu dem System aus *C. acetobutylicum* und anderen Prokaryonten.

4.2.5 Identifizierung von Desulforedoxin als nativer Elektronendonator von Methanoferrodoxin

4.2.5.1 Produktion von Desulforedoxin und Aktivitätsmessung

Nachdem die Aktivität mit Rubredoxin aus *C. acetobutylicum* bestätigt worden war, ergab sich die Frage, mit welchem Enzym Methanoferrodoxin in *Ms. mazei* interagiert. In dem Genom von *Ms. mazei* fand sich kein Gen, das als Rubredoxin annotiert war. Allerdings wurde bei einer genauen Analyse des DNA-Bereichs vor dem ersten Gen des Operons, *mm0629*, ein offenes Leseraster entdeckt, der ein Desulforedoxin kodiert. Rubredoxine und Desulforedoxine sind sehr ähnliche Proteine mit einem [Fe(SCys)₄]-Zentrum; in einigen spektroskopischen und strukturellen Eigenschaften zeigen sie jedoch Unterschiede (18).

Das Desulforedoxin aus *Ms. mazei* konnte in dieser Arbeit in *E. coli* produziert und aufgereinigt werden. Das Spektrum des gereinigten Enzyms ähnelte dem anderer Desulforedoxine und Rubredoxine und zeigte klar, dass das [Fe(SCys)₄]-Zentrum von Desulforedoxin vorhanden war.

Das Enzym wurde in einem Enzymtest als Elektronendonator für die Superoxid-Reduktase eingesetzt. Desulforedoxin wurde durch die NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase aus *C. acetobutylicum* regeneriert. Es zeigte sich, dass eine kleine Elektronentransportkette etabliert werden konnte, wobei Elektronen von NADH über die NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase und Desulforedoxin auf die Superoxid-Reduktase übertragen wurden, die vom letztgenannten Enzym zur Reduktion von Superoxid genutzt wurden. Die Bestimmung einer spezifischen Aktivität war nicht möglich, da es sich um eine Kopplung mehrerer Proteine handelt. Die gemessene NADH-Oxidase-Aktivität des Enzymsystems entsprach der von anderer Superoxid-Reduktasen.

4.2.5.2 Analyse der Aminosäuresequenz von Desulforedoxin

Die Aminosäuresequenz von MMDx zeigte vier Cysteine, die in einem CXXCX₁₉CC-Motiv vorliegen. Das Motiv stimmte mit der Cysteinabfolge von Desulforedoxin aus *D. gigas* überein (33). Zwischen den N- und C-terminalen Cysteinen lagen in beiden Proteinen 19 Aminosäuren. Desulforedoxine und Rubredoxine besitzen ein einkerniges

Eisenzentrum, das von vier Cysteinen koordiniert wird (Abbildung 50). Beide Enzyme unterscheiden sich jedoch in ihrem Cystein-Motiv. Bei Vertretern der ersten Klasse der

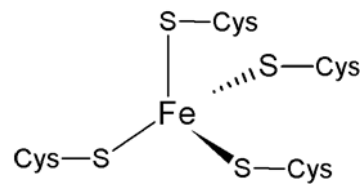


Abbildung 50: Einkerniges $[\text{Fe}(\text{SCys})_4]$ -Zentrums wie es in Desulforedoxin, Rubredoxin und in Desulfoferrodoxinen zu finden ist.

Rubredoxine sind die C-terminalen Cysteine stets durch zwei Aminosäuren, bei Rubredoxinen der zweiten Klasse durch vier Aminosäuren getrennt und liegen nicht wie bei Desulforedoxinen direkt hintereinander (165). Unterschiede in der Anordnung der Cysteine, die das Eisen-Zentrum binden, haben in kleinen Proteinen wahrscheinlich große Auswirkungen auf die Struktur des Proteins und die elektrochemischen Eigenschaften des Metallzentrums. Typischerweise haben Rubredoxine ein Redox-Potential von 0 mV bis +75 mV (121). Das Redox-Potential von MMDx wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt. Die Analyse der Absorption zeigte jedoch, dass das Protein sehr schnell reduziert wird, daher kann davon ausgegangen werden, dass das Protein ebenfalls ein positives Potential besitzt.

Das Gen *mm3193* aus *Ms. mazei* ist ebenfalls als Desulforedoxin annotiert (NP_635217). Das Protein ist ca. 8 kDa groß und mit 10 Cysteinen viel Cystein-reicher als die bekannten Desulforedoxine. Wahrscheinlich ist dieses Protein kein gewöhnliches Desulforedoxin, denn es zeigt keine Ähnlichkeit zu bekannten Desulforedoxinen und Rubredoxinen.

4.2.6 Das [4Fe-4S]-Cluster von Methanoferrodoxin

Wie bereits dargelegt, ist Methanoferrodoxin die erste Superoxid-Reduktase, die ein [4Fe-4S]-Cluster besitzt. Eine Analyse von zahlreichen prokaryontischen Genomen hat gezeigt, dass [4Fe-S]-Cluster in methanogenen *Archaea* weiter verbreitet ist als bei anderen *Archaea* und Bakterien (132). Bei den Methanbildnern sind insbesondere bei Enzymen, die an der Methanogenese beteiligt sind, viele 4Fe-4S]-Cluster als prosthetische Gruppe vorhanden (56).

Im Folgenden soll der Einfluss von Sauerstoffverbindungen, vorzugsweise von Superoxid, auf Eisen-Schwefel-Cluster anhand einiger Beispiele aus der Literatur

beschrieben werden. Superoxid kann Eisenionen sowohl reduzieren, als auch oxidieren und sich dadurch destabilisierend auf [4Fe-4S]-Cluster auswirken. Es ist jedoch umstritten, ob Superoxid eine direkte Wirkung auf prosthetische Gruppen ausübt, oder ob das bei der Reaktion mit Eisenionen gebildete Hydroxyl-Radikal, das chemisch aktiver ist, die eigentliche Gefahr für die Zelle darstellt (36, 65).

Die Enzymklasse der Hydro-Lyase katalysiert die Spaltung von Kohlenstoff-Sauerstoff-Verbindungen unter der Freisetzung von Wasser. Die Enzyme sind in Katabolismus- und Biosynthesewegen verbreitet und besitzen ein [4Fe-4S]-Cluster im aktiven Zentrum. Beispiele sind die Dihydroxy-Säure-Dehydratase und die Aconitat-Hydratase. Superoxid übt sich auf das [4Fe-4S]-Cluster dieser Enzyme sehr destabilisierend aus (60, 76, 77, 95, 114). Bei den Hydro-Lyase handelt es sich jedoch nicht um Redoxenzyme, denn das [4Fe-4S]-Cluster ist hier katalytisch direkt aktiv, indem ein Eisenion an das Substrat bindet (31, 72). Das [4Fe-4S]-Cluster ist an der Oberfläche des Proteins lokalisiert und daher für reaktive Sauerstoffverbindungen besonders leicht zugänglich. Nach der Oxidation durch Superoxid wird das [4Fe-4S]-Cluster instabil und zerfällt zu einem [3Fe-4S]-Cluster, dem das katalytische Eisenion fehlt und daher nicht aktiv ist. *In vivo* können diese Enzyme jedoch durch Schutzenzyme schnell wieder repariert werden (60).

Der Transkriptions-Faktor Fumarat-Nitrat-Reduktase-Regulator (FNR) aus *E. coli* besitzt ebenfalls ein labiles [4Fe-4S]-Cluster, das bei Kontakt mit Sauerstoff zu einem [2Fe-2S]-Cluster zerfällt (109). Der Zerfall bewirkt, dass das Enzym seine aktive Form verliert. In diesem Fall hat sich die Natur die Labilität von [4Fe-4S]-Clustern also zu Nutze gemacht, um Sauerstoff in der Umgebung wahrnehmen zu können. Die Proteinumgebung scheint speziell dafür geschaffen zu sein, dass das [4Fe-4S]-Cluster möglichst effektiv mit Sauerstoff reagiert (51).

Auf der anderen Seite gibt es auch Beispiele von [4Fe-4S]-Clustern, die von der Proteinumgebung stabilisiert werden. Während die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktasen vieler anaerober Organismen Sauerstoff-labil sind, trifft dies auf das Enzym aus *Desulfovibrio africanus* nicht zu. Dieses Enzym wird durch eine C-terminale Erweiterung vor Sauerstoff geschützt und ist daher in der Gegenwart von Sauerstoff stabil (156). Die Sauerstoff-labilen Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktasen werden durch Sauerstoff stärker geschädigt als von Superoxid, ganz im Gegensatz zu den oben besprochenen Hydro-Lyase (150). Der Grund dafür ist unbekannt. Wahrscheinlich ist in Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktasen das [4Fe-4S]-Cluster, das Elektronen auf Ferredoxin überträgt, an der Oberfläche exponiert und daher dem Sauerstoff besonders ausgesetzt (191).

Mit Kaliumsuperoxid wurde getestet, ob Superoxid einen Einfluss auf das Spektrum von MM0632 ausübt. Kaliumsuperoxid wurde in DMSO gelöst und in geringen Mengen einer rekonstituierten Präparation von MM0632 zugegeben. Die Absorption von MM0632 blieb in diesen Experimenten unverändert. Daraus wurde geschlossen, dass das Eisen-Schwefel-Cluster von Methanoferrodoxin nicht so labil ist, wie bei den oben beschriebenen Hydro-Lyasen (Kapitel 3.2.4.2). Eine längere Exposition des rekonstituierten Methanoferrodoxins mit Sauerstoff hatte jedoch ein Ausbleichen des Enzyms zu Folge. Das [4Fe-4S]-Cluster scheint also nicht sauerstoffstabil zu sein. Der Mechanismus der Superoxid-Reduktasen vermeidet aber gerade die Bildung von Sauerstoff, indem Superoxid zu Wasserstoffperoxid reduziert wird. In dem anaeroben Organismus *Ms. mazei* ist das Protein wahrscheinlich keiner andauernden Sauerstoff-Belastung ausgesetzt.

4.2.7 Charakterisierung des Proteins MM0636

Rubrerythrin besitzt ein C-terminales [Fe(SCys)₄]-Zentrum und ein N-terminales zweikerniges Eisenzentrum, das auch als Nicht-Häm-Zwei-Eisen-Zentrum bezeichnet wird. Die Eisenionen sind durch eine Sauerstoffbrücke verbunden und werden durch fünf Glutaminsäuren und ein Histidin koordiniert (Abbildung 51). Das Protein wurde ursprünglich aus *D. vulgaris* aufgereinigt und ist seitdem intensiv untersucht worden (9, 50, 54, 122, 129, 145). In den letzten Jahren konnte für Rubrerythrine aus mehreren Organismen eine NADH-Peroxidase-Aktivität mit Rubredoxin als Elektronendonator nachgewiesen werden. Zuvor wurden weitere Aktivitäten gefunden, darunter eine Pyrophosphatase- und eine Ferroxidase-Aktivität (O₂-abhängige Oxidation von Fe²⁺ zu Fe³⁺) (24, 49, 50, 126), die aber nicht bei allen Rubrerythrinen bestätigt wurden.

In einer Studie wurde das Eisenion des Rubredoxin-Zentrums von Rubrerythrin durch Zink ersetzt. Das so modifizierte Enzym besitzt keine Ferroxidase- und keine NADH-Peroxidase-Aktivität (24, 199). Daraus folgt, dass das Rubredoxin-Zentrum für die Aktivität essentiell ist. MM0636 ist ein Rubrerythrin-ähnliches Protein, das nur das N-terminale, zweikernige Eisenzentrum besitzt. Das Rubredoxin-Zentrum kann wegen der fehlenden Cysteine nicht gebildet werden. Ohne das Rubredoxin-Zentrum sind Rubrerythrine wie oben erwähnt nicht funktionsfähig. Dementsprechend konnte für MM0636 keine Peroxidase-Aktivität mit Rubredoxin oder Desulforedoxin als Elektronendonator oder eine andere Aktivität bestimmt werden.

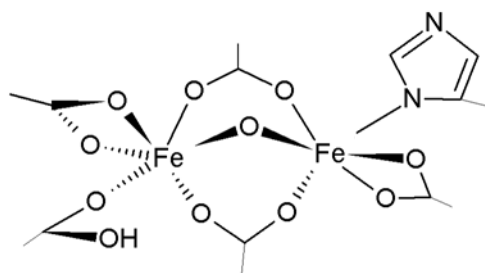


Abbildung 51: Darstellung des zweikernigen Eisenzentrums der Rubrerythrine.

Die Funktion der von den Rubrerythrinen klar unterschiedlichen Proteinklasse ist nicht bekannt. In den Genomen zahlreicher anderer Organismen finden sich ebenfalls Rubrerythrin-ähnliche Proteine mit einem Eisen-Zentrum. Eines dieser Proteine aus *Sulfolobus tokodaii* wurde als Sulerythrin bezeichnet (NP_378371) (197). *M. burtonii* und *M. evestigatum* besitzen anstelle des Rubrerythrin-ähnlichen Proteins MM0636 vollständige Rubrerythrine, die keine Ähnlichkeit zu MM0636 zeigen. Bei *Ms. mazei* liegen zwei vollständige Rubrerythrine, *mm1804* und *mm2198*, an anderen Stellen im Genom. Wahrscheinlich katalysieren die Rubrerythrine in *Ms. mazei* die Reduktion des von der Superoxid-Reduktase gebildeten Wasserstoffperoxids zu Wasser. Daher war zu erwarten, dass die Rubrerythrine mit der Superoxid-Reduktase in einem Operon kodiert sind, wie dies auch bei anderen methanogenen *Archaea* und zahlreichen Bakterien der Fall ist. Eine koordinierte Produktion der Proteine wird in *Ms. mazei* eventuell über einen anderen Weg erreicht. Die zweite Möglichkeit ist, dass die Superoxid- und Wasserstoffperoxid-eliminierenden Enzyme in der Zelle konstitutiv vorhanden sind. In Kapitel 3.2.4.5 wurde gezeigt, dass das Operon *mmdx – mm0636* und andere an der O₂-Abwehr beteiligte Gene nach einem Sauerstoffschock nicht verstärkt exprimiert wurden. Es erfolgt vielmehr eine konstitutive Expression auf geringem oder moderatem Niveau. Aus diesem Grund ist es nicht nötig, dass die Rubrerythrine und die Superoxid-Reduktase in einem Operon organisiert sind.

4.2.8 Homologe Gene von *mmdx* – *mm0636* in anderen methanogenen *Archaea*

Die Gene *mmdx* – *mm0636* sind in methylotrophen Methanbildnern weit verbreitet, allerdings ist die Zusammensetzung des Genclusters in den Organismen unterschiedlich. Tabelle 2 zeigt eine Auflistung der zu den Genen *mmdx* – *mm0636* aus *Ms. mazei* homologen Gene aus *Ms. acetivorans*, *M. burtonii*, *M. mahii*, *M. evestigatum* und *Ms. barkeri*. Die kodierenden Regionen von Isf und AfpA sind in allen untersuchten Arten vorhanden. Das Gen, das für ein Desulforedoxin kodiert, findet sich ebenfalls in allen Genomen mit der Ausnahme von *M. burtonii*, der ein Rubredoxin-Gen besitzt. Rubredoxine sind eine den Desulforedoxinen sehr ähnliche Proteinklasse. *Ms. barkeri* ist der einzige Organismus, der keine Superoxid-Reduktase, keine Disulfid-Reduktase und kein Cytochrom c besitzt. Stromaufwärts des Gens *mbarA0252* befindet sich das Gen *mbardx*, das ebenso wie *mmdx* bei *Ms. mazei* nicht annotiert ist. Das Gen kodiert ein Desulforedoxin, das der Elektronendonator für die Superoxid-Reduktase ist. Da *Ms. barkeri* keine Superoxid-Reduktase besitzt, stellt sich die Frage, welche Funktion das Enzym innehat. Der Organismus nutzt das Desulforedoxin wahrscheinlich als Elektronendonator für die Rubrerythrine, die an anderen Stellen im Genom kodiert sind. *Ms. acetivorans* besitzt einen Gencluster, der dem aus *Ms. mazei* sehr ähnlich ist. Allerdings besitzt *Ms. acetivorans* kein Methanoferrodoxin, sondern ein Neelaredoxin ohne [4Fe-4S]-Cluster und ein Flavoprotein A, das bei *Ms. mazei* in zwei kleine offene Leseraster gespalten ist (*mm0637* und *mm0638*). Bei *M. burtonii* und *M. evestigatum* ist die Superoxid-Reduktase nicht in dem Cluster kodiert, sondern an einer anderen Stelle im Genom. Bei *M. burtonii*, *M. mahii* und *M. evestigatum* ist in dem Cluster das Gen einer Oxidoreduktase kodiert, die wahrscheinlich ein Flavin und ein Eisen-Schwefel-Cluster als prosthetische Gruppen enthält. Bei *Ms. barkeri* ist dieses Protein an einer anderen Stelle im Genom kodiert, während es bei *Ms. acetivorans* und *Ms. mazei* nicht zu finden ist. Diese Oxidoreduktase ist unter methanogenen *Archaea* nicht weit verbreitet, sie findet sich noch in den Genomen von *Methanocella paludicola* (MCP_1161) und Candidatus *Methanosphaerula palustris* (Mpal_1003). Über die Funktion des Proteins ist nichts bekannt. Mit der Ausnahme von *Ms. mazei* ist in allen in der Tabelle 2 gelisteten Organismen das Gen eines Flavoprotein A vorhanden, allerdings in *M. evestigatum* und *Ms. barkeri* an anderen Stellen im Genom. *M. burtonii* und *M. evestigatum* besitzen in dem Gencluster ein vollständiges Rubrerythrin, das als Peroxidase katalytisch aktiv ist und Rubredoxin als Elektronendonator verwendet. Die übrigen Arten weisen nur ein Rubrerythrin-ähnliches Protein, über dessen Funktion nichts bekannt ist (Kapitel 4.2.7).

Homologe Gene zu *mmdx – mm0636* finden sich nicht nur in nahen Verwandten von *Ms. mazei*, sondern auch in hydrogenotrophen methanogenen *Archaea*. *M. jannaschii* ist kein naher Verwandter von *Ms. mazei* und gehört innerhalb der Euryarchaeota einer anderen Ordnung an. In diesem Genom befinden sich die zu *mmdx – mm0636* homologen Gene mit mehreren anderen Genen in einem großen Gencluster. Das Operon enthält homologe Gene zu *mm0635*, *mm0634*, *mm0632* und *mm0631*, allerdings nicht zu *mm0633*. Die Superoxid-Reduktase (MJ0735) ist kein Methanoferrodoxin, denn sie enthält keine zusätzlichen Cysteine, die ein [4Fe-4S]-Cluster aufbauen könnten. Interessanterweise sind in diesem Gencluster neben der Superoxid-Reduktase noch weitere Gene kodiert, die bei oxidativem Stress eine Rolle spielen könnten. Darunter sind zwei Peroxidasen aus der Rubrerythrin-Proteinfamilie (MJ0734, MJ0746), ein Rubredoxin (MJ0735), ein Flavodoxin (MJ0732) und ein Peroxiredoxin (MJ0736). Die Häufung von Genen in diesem Cluster, deren Produkte zur Entgiftung von Sauerstoffverbindungen beitragen können, macht es wahrscheinlich, dass auch die Genprodukte des Operons *mmdx – mm0636* aus *Ms. mazei* und die homologen Proteine aus den anderen hier diskutierten Organismen eine Funktion in der zellulären Abwehr von Sauerstoffstress ausüben.

Tabelle 2: Gegenüberstellung der Gene *mmdx – mm0636* und der entsprechenden Genbereiche von *Ms. acetivorans*, *M. burtonii*, *M. mahii*, *M. evestigatum* und *Ms. barkeri*. Über den Spalten ist der Name der Enzymklasse angegeben. Wenn ein Gen ein Enzym aus einer anderen als der angegebenen Klasse kodiert, wird der Name dieser Klasse unter der Gennummer benannt. Boxen um Gennummern bedeuten, dass diese Gene nicht mit den übrigen in einem Gencluster liegen.

	Desulforedoxin	Transkriptions-Faktoren		Disulfid-Reduktase
<i>Ms. mazei</i>	<i>mmdx</i>	<i>mm0629</i>	<i>mm0630</i>	<i>mm0631</i>
<i>Ms. acetivorans</i>	<i>ma4664</i>	<i>ma3734</i>	<i>ma3735</i>	<i>ma3736</i>
<i>M. burtonii</i>	<i>mbur0091</i> Rubredoxin	<i>mbur2373</i>	<i>mbur2374</i>	<i>mbur2375</i>
<i>M. mahii</i>	<i>mmah1514</i>	<i>mmah1515</i>	<i>mmah1516</i>	<i>mmah1517</i>
<i>M. evestigatum</i>	<i>metev2141</i>	<i>metev2142</i>	<i>metev2143</i>	<i>metev2144</i>
<i>Ms. barkeri</i>	<i>mbardx</i> (240 Bp vor mbar_A2452)	-	-	-
	Methanoferrodoxin	Cytochrom c		Isf
<i>Ms. mazei</i>	<i>mm0632</i>	<i>mm0633</i>	-	<i>mm0634</i>
<i>Ms. acetivorans</i>	<i>ma3737</i> Neelaredoxin	<i>ma3739</i>	-	<i>ma3740</i>
<i>M. burtonii</i>	<i>mbur0835</i>	<i>mbur2376</i>	-	<i>mbur2377</i>
<i>M. mahii</i>	<i>mmah1131</i>	<i>mmah1518</i>	<i>mmah1519</i> Ferredoxin	<i>mmah1520</i>
<i>M. evestigatum</i>	<i>metev1346</i>	<i>metev2145</i>	-	<i>metev2146</i>
<i>Ms. barkeri</i>				<i>mbarA0252</i>
	Oxidoreduktase1	AfpA	Ruberrythrin	FlavoproteinA
<i>Ms. mazei</i>	-	<i>mm0635</i>	<i>mm0636</i> Ruberrythrin-ähnlich	<i>mm0637/8</i> defekt
<i>Ms. acetivorans</i>	-	<i>ma3741</i>	<i>ma3742</i> Ruberrythrin-ähnlich	<i>ma3743</i>
<i>M. burtonii</i>	<i>mbur2378</i>	<i>mbur2380</i>	<i>mbur2379</i> Ruberrythrin	<i>mbur2383</i>
<i>M. mahii</i>	<i>mmah1521</i>	<i>mmah1522</i>	<i>mmah1536</i> Ruberrythrin-ähnlich	<i>mmah1537</i>
<i>M. evestigatum</i>	<i>metev2147</i>	<i>metev2149</i>	<i>metev2148</i> Ruberrythrin	<i>metev2153</i>
<i>Ms. barkeri</i>	<i>mbarA3236</i>	<i>mbarA0251</i>	<i>mbarA0250</i> Ruberrythrin-ähnlich	<i>mbarA3353</i>

4.2.9 Suche nach dem nativen Elektronendonator von Desulforedoxin aus *Ms. mazei*

Methanoferrodoxin ist die erste Superoxid-Reduktase mit einem Eisen-Schwefel-Cluster als zweite prosthetische Gruppe. Über die Funktion des [4Fe-4S]-Cluster ist allerdings nichts bekannt. Eventuell ist das [4Fe-4S]-Cluster in der Lage, Elektronen von einem noch unbekanntem Donor an das katalytische [Fe(NHis)₄(SCys)]-Zentrum weiterzugeben. Die Regeneration von Methanoferrodoxin wurde in dieser Arbeit durch Desulforedoxin erreicht, das mit Methanoferrodoxin in einem Operon kodiert ist. Das spricht dafür, das Desulforedoxin der native Elektronendonator ist. Für die mit der NADH-Oxidoreduktase und Desulforedoxin oder Rubredoxin detektierte Superoxid-Reduktase-Aktivität von MM0632 war das [4Fe-4S]-Cluster nicht essentiell (Kapitel 3.2.4.3). In Arbeiten mit Desulfoferrodoxin wurde ein ähnliches Ergebnis erzielt (47, 64). Zum einen wurden bei Desulfoferrodoxin aus *D. vulgaris* die Cysteine, die das [Fe(SCys)₄]-Zentrum koordinieren, deletiert, ohne dass die Aktivität beeinträchtigt wurde. Zweitens zeigen Kristallstrukturen, dass die Entfernung zu dem katalytischen Zentrum zu groß ist und daher keine Elektronen zwischen den Metallzentren transportiert werden können.

Im Rahmen der Untersuchungen zu Methanoferrodoxin wurde versucht, das Enzym zu identifizieren, das in *Ms. mazei* für die Reduktion von Desulforedoxin, dem nativen Elektronendonator, verantwortlich ist. Eventuell bilden die übrigen in dem Operon *mmdx* – *mm0636* kodierten Proteine ein noch unbekanntes Elektronen-Donor-System. Die Flavin-haltigen Enzyme MM0635 und MM0634 waren hierfür gute Kandidaten. Die Untersuchungen zu MM0634 und MM0645 haben gezeigt, dass beide Enzyme Elektronen von Ferredoxin annehmen können, während weder F₄₂₀H₂ noch NADPH oder NADH die Flavine reduzieren konnten (Kapitel 3.2.6; 3.2.7). Die Möglichkeit, dass die Flavin-haltigen Enzyme die Elektronen von Ferredoxin auf Desulforedoxin übertragen, ist nicht auszuschließen, da Ferredoxine im Allgemeinen ein viel negativeres Potential aufweisen als Desulforedoxine.

In *Ms. mazei* können Ferredoxine von der CO-Dehydrogenase, der Ech-Hydrogenase, der Formyl-Methanofuran-Dehydrogenase und der Ferredoxin-abhängigen Pyruvat-Oxidoreduktase reduziert werden. Außerdem sind in dem Genom weitere Ferredoxin-abhängige Oxidoreduktasen kodiert (58). Ferredoxine sind für den methanogenen Metabolismus offensichtlich von großer Bedeutung und könnten daher auch eine Funktion als Elektronendonator für Methanoferrodoxin innehaben. Ferredoxin aus *C. pasteurianum* konnte jedoch keine Elektronen direkt an das [4Fe-4S]-Cluster des Methanoferrodoxins abgeben und in einem Test mit NADP⁺-Ferredoxin-

Oxidoreduktase, Clostridien-Ferredoxin und Methanoferredoxin wurde keine NADPH:Superoxid-Reduktase-Aktivität registriert. Die Reduktion von Superoxid durch MM0632 gelang nur, wenn die NADPH:Rubredoxin-Oxidoreduktase und Rubredoxin aus Clostridien oder Desulforedoxin aus *Ms. mazei* zugesetzt wurden.

Proteine wie die NADP⁺-Ferredoxin-Oxidoreduktase und die CO-Dehydrogenase können neben Ferredoxin auch Rubredoxin, das Desulforedoxin sehr ähnlich ist, direkt reduzieren (161). Daher wurde in dieser Arbeit versucht, Desulforedoxin durch die NADP⁺-Ferredoxin-Oxidoreduktase und die CO-Dehydrogenase zu reduzieren. Die Reduktion sollte anhand der Absorption von Desulforedoxin verfolgt werden. Während die Reduktion von Desulforedoxin durch die NADP⁺-Ferredoxin-Oxidoreduktase und NADPH gelang, ließ sich die Reaktion mit der CO-Dehydrogenase nicht nachweisen. Entweder reagiert die hier verwendete CO-Dehydrogenase aus *Mta. thermoacetica* nicht mit dem Desulforedoxin, oder die schwierigen Messbedingungen ließen eine Detektion der Aktivität nicht zu. Die CO-Dehydrogenase ist sauerstoffempfindlich und benötigt in der Regel eine Anlaufzeit, bis sie in einer Messküvette Aktivität zeigt. Die Enzymaktivität sollte anhand der Absorption von Desulforedoxin verfolgt werden, das Protein wird jedoch von Reduktionsmitteln wie DTE schnell reduziert, so dass die erwähnten Enzymreaktionen nicht in Einklang gebracht werden konnten.

Die direkte Übertragung von Elektronen durch die CO-Dehydrogenase wäre eine Möglichkeit der Reduktion von Desulforedoxin. Eine weitere wäre die Reduktion durch MM0634 und MM0645, die Ferredoxin als Elektronendonator verwenden. Ein Enzymtest, der eine Ferredoxin:Desulforedoxin-Oxidoreduktase-Aktivität der Proteine MM0634 und MM0635 nachweisen soll, müsste eine Oxidoreduktase enthalten, die Ferredoxin reduziert. Die NADP⁺-Ferredoxin-Oxidoreduktase konnte aus dem Grunde nicht benutzt werden, da sie Elektronen an Ferredoxin und Desulforedoxin abgibt. Bei Verwendung der CO-Dehydrogenase zur Reduktion von Ferredoxin enthielt die Elektronentransportkette keine Komponente, anhand der die Aktivität photometrisch verfolgt werden konnte. Aus diesen Gründen konnte eine Elektronentransportkette, die eine Ferredoxin:Desulforedoxin-Oxidoreduktase-Aktivität der Proteine MM0634 und MM0635 nachweist, in dieser Arbeit nicht etabliert werden.

Den Proteinen MM0634 und MM0635 konnte bislang keine Rolle in der Reduktion von Desulforedoxin zugeschrieben werden. In nahen Verwandten von *Ms. mazei* sind noch weitere Oxidoreduktasen vorhanden, die diese Funktion ausüben könnten (Kapitel 4.2.8) (Tabelle 2). Das Flavoprotein A ist in allen hier untersuchten Organismen vorhanden, einzig in *Ms. mazei* ist es defekt. Außerdem besitzen *M. burtonii*, *M. mahii*, *M. evestigatum* und *Ms. barkeri* eine Oxidoreduktase 1, die sich bei *Ms. mazei* und

Ms. acetivorans nicht findet. Da weder Flavoprotein A noch Oxidoreduktase 1 eine Ähnlichkeit zu bekannten Enzymen aufweisen, bleibt ihre Funktion unklar. In nicht-methanogenen *Archaea* wie *A. fulgidus* und *P. furiosus* sowie Clostridien und δ -Proteobakterien wird Rubredoxin, das in *Ms. mazei* durch Desulfiredoxin ersetzt ist, durch eine NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase regeneriert (129, 163, 165, 199). Eine Oxidoreduktase, die eine zu 25 % identische Sequenz mit der NADH:Rubredoxin-Oxidoreduktase aus *C. acetobutylicum* (*cac2448*) besitzt, ist in dem Genom von *Ms. mazei* ebenfalls annotiert (*mm1296*). Das Protein findet sich außer in *M. mahii* in allen hier untersuchten methanogenen *Archaea*. Das homologe Protein des hydrogenotrophen methanogenen *M. jannaschii* wurde als NADH:O₂-Oxidase beschrieben, wobei die Autoren vermuten, dass es noch weitere Elektronenakzeptoren *in vivo* geben könnte (38). NADH und NADPH sind allerdings keine zentralen Kofaktoren in methanogenen *Archaea*, daher ist unklar, wie sie regeneriert werden (56). Der zentrale Kofaktor der Methanogenen ist F₄₂₀H₂, der in dieser Arbeit nicht mit der Reduktion von Desulfiredoxin oder Methanoferrodoxin in Verbindung gebracht werden konnte. Bemerkenswerterweise ist F₄₂₀H₂ der direkte Elektronendonator eines Sauerstoff-reduzierenden Enzyms aus *Methanothermobacter marburgensis* (Kapitel 4.2.12), für das auch eine Rolle in der Abwehr von Sauerstoffstress angenommen wird (176). Es kann also nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass F₄₂₀H₂ in den Elektronentransport auf Methanoferrodoxin involviert ist.

4.2.10 Beteiligung der Proteine MMDx – MM0636 in der zellulären Verteidigung gegen Sauerstoff und Sauerstoffradikale

Wie in dieser Arbeit beschrieben, kodiert das Operon *mmdx* – *mm0636* mehrere Proteine, die mit der Abwehr von reaktiven Sauerstoffverbindungen in Verbindung gebracht werden. In allen hier untersuchten methanogenen *Archaea* liegen homologe Gene in demselben Gencluster mit mehreren Genen, deren korrespondierende Proteine die Zelle ebenfalls vor Sauerstoffstress schützen (Tabelle 2). In *Ms. mazei* sind diese Gene, wie beispielsweise das Rubrerythrin, über das Genom verteilt. Ein weiterer Hinweis auf die Funktion der Proteine lieferte die in dieser Arbeit erfolgte Charakterisierung von MM0632 als Superoxid-Reduktase mit Desulfiredoxin als Elektronendonator. Da MM0632 vermutlich eine bedeutende Rolle bei der Abwehr von Superoxid zukommt, üben die übrigen Proteine der Transkriptionseinheit wahrscheinlich auch eine noch unbekannt Funktion bei der Abwehr von Sauerstoffstress aus. Neben der Superoxid-Reduktase und den beiden Rubrerythrinen besitzt *Ms. mazei* auch das klassische System zur Abwehr von reaktiven Sauerstoffverbindungen, eine Superoxid-Dismutase und zwei Katalasen. Warum

Ms. mazei wie auch Sulfat-reduzierende Bakterien wie *D. gigas* beide Systeme besitzen, während andere Prokaryonten wie *T. paladium* und *A. fulgidus* nur von einem Proteinsystem Gebrauch machen, ist nicht geklärt (2, 101). Wahrscheinlich sind Superoxid-Reduktasen und Rubrerythrine vorteilhaft, da sie keinen molekularen Sauerstoff bilden und Reduktionsäquivalente oxidieren, die in der Zelle oft die Quelle für die Bildung von Superoxid sind. Die Präsenz von zwei Enzym-Systemen in *Ms. mazei*, die mehrere reaktive Sauerstoffverbindungen entgiften können, zeigt, dass der Organismus sich bis zu einem gewissen Grad vor dem toxischen Einfluss von Sauerstoff in seiner Umgebung schützen kann. Diese Analyse wird durch den Laboralltag bestätigt, wo die routinemäßige Kultivierung von *Ms. mazei* zeigt, dass die Zellen den Kontakt mit Sauerstoff überleben.

In den folgenden Kapiteln wird die Charakterisierung der Proteine MM0633 sowie MM0634 und MM0635 diskutiert. Hier wird der Schwerpunkt nicht mehr auf die Funktion der untersuchten Proteine in der Antwort auf Sauerstoffstress gelegt, sondern die Hypothese diskutiert, ob das Cytochrom und die Flavoproteine mit dem Elektronentransport über die Membran in Verbindung stehen.

4.2.11 Eigenschaften des Proteins MM0633 aus *Ms. mazei*

Häm *c* ist als prosthetische Gruppe von Proteinen an einer großen Zahl von Reaktionen beteiligt. *c*-Typ-Cytochrome fungieren in Prokaryonten als Peroxidasen, Katalasen, Bacterioferritin und assimilatorische Sulfid-Reduktasen (193). Sehr häufig sind sie Teil einer Atmungskette. Cytochrome mit Häm *c* finden sich in der Regel in zwei Formen. Zu den löslichen Cytochromen gehört beispielsweise Cytochrom *c*, das an der Außenseite der Cytoplasmamembran Elektronen von dem Cytochrom *bc₁-*Komplex an die terminale Oxidase weitergibt, oder SoxXA aus *Allochromatium vinosum*, das an der Thiosulfatoxidation beteiligt ist. Viele andere *c*-Typ-Cytochrome sind über einen N-terminalen Anker mit der Membran verbunden. Die Vertreter der NapC/NirT Familie verbinden den Chinonpool der Membran mit Oxidoreduktasen außerhalb der cytoplasmatischen Membran. Zu der umfangreichen Familie gehören TorC von *E. coli*, ein Cytochrom mit fünf Häm *c*-Gruppen, das Elektronen an die Trimethylamin-N-Oxid-Reduktase weitergibt (78), NrfH aus *W. succinogenes*, das mit der Cytochrom *c* Nitrit-Reduktase interagiert (63) und DorC aus *Rhodobacter capsulatus*, das Elektronen an eine Dimethylsulfoxid-Reduktase überträgt (177). Membranintegrale Häm-Kupfer-Proteine, die Cytochrom *c* oxidieren, wie der *caa₃* und *cbb₃*-Komplex, bilden oft die Endoxidasen aerober Atmungsketten. Mit dieser Aufzählung ist die Vielfalt bakterieller *c*-Typ-Cytochrome noch nicht erschöpft.

In *Archaea* sind *c*-Typ-Cytochrome viel weniger verbreitet. Bei den methanogenen *Archaea* kommen Cytochrome nur in der Ordnung *Methanosarcinales* vor. Insgesamt sind Cytochrome aus *Archaea* kaum erforscht und kein einziges Cytochrom *c* ist bislang aufgereinigt worden. In dieser Arbeit wurde daher dem Versuch, das Protein MM0633 aufzureinigen und zu beschreiben große Bedeutung beigemessen, da es wertvolle Informationen über Cytochrome in dieser Organismengruppe liefern könnte.

Eine bioinformatische Untersuchung der Cytochrom *c*-Biogenese-Gene hat gezeigt, dass *Ms. mazei* das Cytochrom *c*-Biogenese-Operon (*ccm*-Gene) besitzt, wie es auch in α -, β -, γ -Proteobakterien vorkommt, wenn auch mit einigen Modifikationen (4). In einer früheren Studie wurden die Cytochrome von *Ms. mazei* einer Untersuchung unterzogen, wobei die Signale der *b*-Typ-Cytochrome und von zwei Cytochrom *c* gefunden wurden (104). In dem Genom von *Ms. mazei* ist allerdings mit MM0633 nur ein einziges Cytochrom *c* kodiert. Orthologe zu MM0633 finden sich lediglich in den sequenzierten Genomen von *Ms. acetivorans*, *M. burtonii* (YP_566978), *M. mahii* (YP_003542659), und *M. evestigatum* (YP_003727768). Diese Arten gehören alle zu der Gruppe III der methanogenen *Archaea*, die schon bei der Verbreitung von Methanoferrodoxin diskutiert wurde.

Während in *Ms. mazei* MM0633 das einzige Cytochrom ist, besitzen die übrigen oben genannten Methanogenen noch weitere Cytochrome. Der Rnf-Proteinkomplex enthält ein Cytochrom *c* mit sieben Häm-Bindemotiven, das sich bei *Ms. acetivorans* (NP_615620), *M. burtonii* (YP_566050), *M. mahii* (YP_003542836), und *M. evestigatum* (YP_003727595) findet. Der Proteinkomplex ist vermutlich an dem Elektronen-Transfer von Ferredoxin an den Phenazin-Pool beteiligt. In *Ms. mazei* findet sich kein Rnf-Komplex, hier übernimmt dessen Rolle der Ech-Proteinkomplex, der kein Cytochrom *c* enthält. *Ms. acetivorans* besitzt zwei Dihäm-Cytochrom *c*-Peroxygenasen, die wahrscheinlich im Methylamin-Stoffwechsel eine Rolle spielen (NP_617804 und NP_617819) und sich in keinem anderen Methanproduzenten finden.

M. burtonii (YP_564804), *M. mahii* (YP_003541896) und *M. evestigatum* (YP_003727705) besitzen ein Cytochrom *c* mit sieben CXXCH-Motiven und einem CXXCK-Motiv. Darüber hinaus finden sich in den Genomen von *M. burtonii* und *M. mahii* weitere *c*-Typ-Cytochrome: *M. burtonii* besitzt ein Okta-Häm-Cytochrom *c* (YP_566050) und *M. mahii* gleich drei weitere Okta-Häm-Cytochrom *c*, die sich bei keinem anderen der zur Zeit vorliegenden Genome von methanogenen *Archaea* finden (YP_003541376, YP_003542440, YP_003542449). Die Aufzählung zeigt, dass *c*-Typ-Cytochrome bei der Gruppe III der methanogenen *Archaea* relativ weit verbreitet sind, wobei MM0633 das einzige ist, das bei allen vier genannten Arten vorhanden ist. Über die Funktion dieser interessanten Enzyme ist bislang noch nichts bekannt.

Das Protein MM0633 konnte in *E. coli* produziert und bis zur Homogenität gereinigt werden. Hierbei zeigte sich jedoch, dass das heterolog produzierte Protein nicht komplett mit den fünf vorhergesagten Häm-Gruppen versehen war, wie anhand des Verhältnisses von Soret-Peak und Absorption bei 280 nm und einer Häm-Quantifizierung (0,5-0,9 Häm pro Monomer) ermittelt wurde (Kapitel 3.2.5.1). Die Variation der Produktionsbedingungen und Klonierung des Gens in verschiedene Vektoren mit unterschiedlichen Signalpeptiden, Promotoren und Protein-Tags brachte keine Verbesserung. Auch eine Produktion in *W. succinogenes* verlief weitgehend erfolglos. Der Gehalt von produziertem MM0633 in den Zellen war nicht sehr hoch, wie mittels Häm-Färbung der Membran von *W. succinogenes* ermittelt wurde (Dr. Melanie Kern, Universität Freiburg). Zudem war das Protein membrangebunden und konnte in dieser Arbeit nicht aus *W. succinogenes* aufgereinigt werden.

Die biochemischen Tests, die mit dem aus *E. coli* gereinigten Protein durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass MM0633 mit reduziertem Hydroxy-Phenazin reagiert, wobei das Phenazin-Derivat oxidiert wird und die Häm c-Gruppen reduziert werden (Kapitel 3.2.5.1). Diese Beobachtungen belegen, dass das Cytochrom c mit dem Phenazinpool der Membran von *Ms. mazei* *in vitro* interagiert und Elektronen über die Häm c-Gruppen auf einen Elektronenakzeptor im extrazellulären Raum übertragen könnte. Eine solche Reaktion ist die Grundfunktion der meisten Multi-Häm c-Cytochrome, wie sie oben beschrieben wurden und war daher auch für MM0633 zu erwarten. Der extrazelluläre Elektronenakzeptor konnte noch nicht identifiziert werden, weder durch Experimente mit aufgereinigtem Protein, noch in Enzymtests mit gereinigten Membranen. Für die Experimente mit Cytoplasmamembranen wurden Membranen der $\Delta mm0633$ -Mutante und des *Ms. mazei*-Wildtyps eingesetzt und der Elektronentransport von $F_{420}H_2$ auf verschiedene alternative Akzeptoren getestet. Als alternative Akzeptoren wurden Natriumnitrat, Kaliumnitrit, Natriumsulfit, Trimethylaminoxid, Magnesiumsulfat, Natriummanganat, Huminsäure verschiedene Eisenverbindungen verwendet. Die gereinigten Membranen der $\Delta mm0633$ -Mutante und des Wildtyps reagierten mit Fe^{3+} -Verbindungen und Huminsäure, aber mit keiner der anderen Chemikalien. Da diese Aktivität auch mit der $\Delta mm0633$ -Mutante gemessen wurde, wird die Reduktion von Fe^{3+} -Verbindungen und Huminsäure nicht durch MM0633 katalysiert. In der Literatur finden sich tatsächlich Hinweise darauf, dass methanogene *Archaea* neben dem Heterodisulfid weitere Elektronenakzeptoren verwenden können, dazu gehören elementarer Schwefel, Huminsäure und Eisenionen (23, 40, 188). Ganze Zellen von *Ms. barkeri* können Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduzieren, allerdings ist die Fähigkeit Fe^{3+} zu reduzieren nicht bei allen Methanarchaea vorhanden, denn das Wachstum von hydrogenotrophen Vertretern der Methanogenen (Gruppe I und II) wird

durch Fe^{3+} gehemmt (22). Dieser Unterschied zwischen den Gruppen I und II einerseits und den vornehmlich methylo trophen Methanogenen der Gruppe III ist wahrscheinlich in der unterschiedlichen Ausstattung an Enzymen zu suchen. *Ms. barkeri* besitzt allerdings kein Cytochrom *c* (130), daher muss ein anderes, wahrscheinlich membrangebundenes Enzym diese Reaktion katalysieren.

4.2.12 Eigenschaften der Proteine MM0634 und MM0635

Cruz und Ferry (2005) haben postuliert, dass die Proteinklasse Isf, zu der auch MM0634 gehört, die Zellen von methanogenen *Archaea* mit einer Ferredoxin: $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2^-$ Oxidoreduktase-Aktivität vor Sauerstoffverbindungen schützen. Die Autoren konnten zeigen, dass Isf aus *Ms. thermophila* H_2O_2 und O_2 mit Elektronen von Ferredoxin zu Wasser reduziert (52). Sie erwähnen allerdings auch, dass es zusätzlicher Studien bedarf, die belegen, dass Isf die Reaktion *in vivo* katalysiert. Dass Proteine mit Flavin-Cofaktoren O_2 zu H_2O_2 reduzieren können, ist lange bekannt (134). Unklar ist, wie Isf mit vier Elektronen O_2 zu H_2O reduziert, da das FMN zwei Elektronen und das [4Fe-4S]-Cluster ein Elektron bereitstellen kann. Die einzigen bekannten Flavin-haltigen Enzyme, die molekularen Sauerstoff zu H_2O reduzieren können, sind Rubredoxin: O_2 -Oxidoreduktasen, die insbesondere bei Clostridien und Sulfat-reduzierenden δ -Proteobakterien beschrieben wurden. Rubredoxin, der Elektronendonator dieser Enzyme, wird von einer NADH-Oxidase regeneriert. Diese Enzyme besitzen zwei prosthetische Gruppen, Flavin und ein Zwei-Eisen-Zentrum (Abbildung 51). Das Zwei-Eisen-Zentrum besteht, wie bei dem Protein MM0636, aus zwei Eisenionen, die über eine Sauerstoffbrücke miteinander verbunden sind und durch eine Glutaminsäure sowie mehrere Histidine und Aspartate koordiniert werden Kapitel (4.2.7). Das zweikernige Eisenzentrum ist für die Reduktion von O_2 zu Wasser verantwortlich und kann neben O_2 auch NO zu N_2O reduzieren. Das Flavin transferiert Elektronen von Rubredoxin zu dem aktiven Zentrum (89, 178, 196). Ein solches Enzym wurde auch in methanogenen *Archaea* gefunden. FprA ist eine F_{420}H_2 -Oxidase aus *Methanobrevibacter arboriphilus*, die ein FMN und ein zweikerniges Eisenzentrum als prosthetische Gruppen besitzt (ACA13278). Das Enzym ist in der Lage, O_2 mit Elektronen aus F_{420}H_2 zu Wasser zu reduzieren (175).

Ein zu FprA homologes Protein findet sich auch in *Ms. mazei* (MM3187, NP_635211) und *Ms. acetivorans* (NP_618270). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen hat gezeigt, dass in den Proteinen aus *Ms. mazei* und *Ms. acetivorans* alle Aminosäuren, die das zweikernige Eisenzentrum in *Methanothermobacter marburgensis* koordinieren, vorhanden sind (176). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Proteine ebenfalls eine $\text{F}_{420}\text{H}_2:\text{O}_2$ -Oxidoreduktase-Aktivität besitzen. Falls das Enzym in

Ms. mazei aktiv ist, könnte es die Zelle effektiv vor molekularem Sauerstoff schützen. Damit wäre eine vergleichbare Reaktion für das Isf-Protein MM0634, wie eingangs erwähnt, überflüssig.

Die Proteine MM0634 und MM0635 kodieren Flavin-haltige Enzyme, wobei in MM0635 Flavin die einzige prosthetische Gruppe ist, während in MM0634 zusätzlich ein Eisen-Schwefel-Cluster von vier Cysteinen gebunden wird. Proteine vom Isf- und ApfA-Typ sind in methanogenen *Archaea* weit verbreitet und oft in einem Operon organisiert. Für die Proteine MM0634 und MM0635, sowie den homologen Proteinen aus *Ms. thermophila* wurde Ferredoxin als Elektronendonator identifiziert (15, 59). Ferredoxin ist der Elektronenakzeptor der CO-Dehydrogenase, die ein Schlüsselenzym in dem Stoffwechsel der Gattungen *Methanosarcina* und *Methanosaeta* bei Wachstum mit Acetat ist. Der CO-Dehydrogenase/AcetylCoA-Synthase-Komplex spaltet Acetyl-CoA, die aktivierte Form von Acetat, und katalysiert die Oxidation von CO zu CO₂ sowie den Transfer der Methylgruppe in den zentralen Stoffwechselweg der Methanogenese (56). Die funktionale Verknüpfung von MM0634 und MM0635 mit Ferredoxin und damit mit der CO-Dehydrogenase macht eine Beteiligung der Flavoproteine an der Energiekonservierung möglich. Eine Hypothese, zu dessen Klärung diese Arbeit beitragen sollte, besagte, dass die Proteine MM0634 oder MM0635 eine Funktion in dem Elektronentransfer von Ferredoxin in die methanogene Atmungskette innehaben. In dem nachstehenden Absatz soll der aktuelle Stand der Forschung zu den Enzymkomponenten dargestellt werden, die Elektronen von Ferredoxin für die Energiekonservierung verfügbar machen.

Der zentrale Weg der Methanogenese kann in oxidativer und in reduktiver Richtung verlaufen. Bei Wachstum auf Methanol wird die Oxidation von Methylgruppen zu CO₂ betrieben. Das Enzym Formyl-Methanofuran-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von Formyl-MFR zu CO₂ und generiert reduziertes Ferredoxin. Die Ech-Hydrogenase gibt die Elektronen von reduziertem Ferredoxin an Protonen weiter und bildet molekularen Wasserstoff. Die Differenz des Redoxpotentials zwischen Ferredoxin (etwa -500 mV) und dem Elektronenakzeptor H⁺ (-414 mV) wird von der Ech-Hydrogenase in Form eines Protonengradienten konserviert (139, 201).

Die Ech-Hydrogenase ist jedoch nicht das einzige Enzym, das reduziertes Ferredoxin oxidiert. Eine *Ms. barkeri*-Mutante, deren Ech-Hydrogenase deletiert wurde, wuchs weiterhin auf Methanol (140). Der Stoffwechsel dieser Mutante kann jedoch nur aufrechterhalten werden, wenn das durch die Oxidation der Methyl-Gruppen reduzierte Ferredoxin regeneriert wird. Ansonsten muss die Oxidation von Methylgruppen zum Erliegen kommen, wenn der Formyl-Methanofuran-Dehydrogenase kein oxidiertes

Ferredoxin als Substrat zur Verfügung steht. Die Ech-Mutante von *Ms. mazei* verstoffwechselt TMA schneller als der Wildtyp (201). Der Grund dafür ist der fehlende Beitrag der Ech-Hydrogenase zum Aufbau des Protonengradienten in der Ech-Mutante. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Ech-Mutante von *Ms. barkeri* ebenfalls schneller Methanol verstoffwechselt, als der Wildtyp. Dies verdeutlicht abermals, dass es in *Ms. mazei* und *Ms. barkeri* ein effektives Ferredoxin-regenerierendes System neben der Ech-Hydrogenase geben muss. MM0634 und MM0635 waren Kandidaten für dieses System. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Enzyme MM0634 und MM0635 Ferredoxin oxidieren, es konnte aber kein Elektronenakzeptor identifiziert werden. Die Enzyme reagieren nicht mit F_{420} , NAD^+ , oder $NADP^+$. Daher ist es unwahrscheinlich, dass sie eine Funktion als Ferredoxin-regenerierende Enzyme ausüben, die mit der Energiekonservierung in *Ms. mazei* in Verbindung steht. Im Laufe der Ausarbeitung dieser Arbeit wurde durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen, dass das Protein FpoF (NP_632651) aus *Ms. mazei* die Elektronen von Ferredoxin auf F_{420} übertragen kann (200). Damit ist auch FpoF in der Lage, reduziertes Ferredoxin zu regenerieren. In Rahmen dieser Arbeit wurde dagegen gezeigt, dass MM0634 und MM0635 diese Reaktion nicht katalysieren können. Auch dem Protein MM0633 konnte in dieser Arbeit keine Rolle in der Energiekonservierung zugewiesen werden. Die Analyse der $\Delta mm0633$ -Mutante hat gezeigt, dass die Wachstumsraten der Mutante auf keinem Substrat beeinträchtigt waren. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Proteine MMDx – MM0636 in *Ms. mazei* für die Energiekonservierung nicht von Bedeutung sind und eine andere Funktion innehaben müssen.

5. Zusammenfassung

1. Bei Wachstum von *Ms. mazei* auf TMA wurde der Substratverbrauch und die Bildung der Zwischenprodukte DMA und MMA untersucht. Zum ersten Mal wurde nachgewiesen, dass *Ms. mazei* TMA stufenweise demethyliert, die Zwischenprodukte DMA und MMA zum Teil aus der Zelle transportiert und erst verstoffwechselt, wenn das TMA verbraucht ist.
2. Der Methylgruppen-Transfer in *Ms. mazei* von Methylaminen in den zentralen Stoffwechselweg der Methanogenese wird von zwei Methyltransferasen und einem Corrinoid-Protein katalysiert. Es existieren spezifische Methyltransferasen für TMA, DMA und MMA, sowie mehrere Isoenzyme. Eine Transkriptionsanalyse konnte zeigen, dass einige Gene der Isoenzyme in Abhängigkeit von der Wachstumsphase exprimiert werden. So wurden in der exponentiellen Phase des Wachstums große Mengen polycistronischer mRNA des Operons *mtt1/mtb1* gefunden. In der späten exponentiellen Phase ($OD_{600} > 2$) war die relative Menge der Transkripte von *mtb3* und *mtmC1* stark gesteigert. Die Aktivität der entsprechenden Enzyme konnte mit dem TMA-, DMA- und MMA-Gehalt im Kulturüberstand in Zusammenhang gebracht werden.
3. Das Gencluster *mmdx – mm0636* bilden ein Operon, das für mehrere Enzyme kodiert, die zum einen mit der Abwehr von reaktiven Sauerstoffverbindungen, und zum anderen mit dem Elektronentransport in *Ms. mazei* in Zusammenhang gebracht werden. Das Operon wurde nach einem Sauerstoffschock der Zellen nicht vermehrt exprimiert, wie eine Transkriptions-Analyse ergab.
4. Die Proteine MMDx, MM0631, MM0632, MM0634, MM0635, MM0636 wurden heterolog in *E. coli* produziert. Die Charakterisierung der aufgereinigten Proteine ergab, dass sie verschiedene prosthetische Gruppen binden, die alle erfolgreich in die Proteine eingebaut wurden. Auch das c-Typ-Cytochrom MM0633 wurde in *E. coli* produziert, jedoch konnten hier nicht alle fünf vorhergesagten Häm-Gruppen pro Protein nachgewiesen werden.
5. Es wurde eine definierte *Ms. mazei*-Deletionsmutante erzeugt, die kein Cytochrom c mehr produzieren konnte. Diese $\Delta mm0633$ -Mutante zeigte jedoch kein verändertes Wachstum, sodass das c-Typ-Cytochrom in *Ms. mazei* wahrscheinlich nicht in die Energiekonservierung involviert ist.

6. Die Analyse von MM0631 ergab, dass das Protein ein Eisen-Schwefel-Cluster bindet und im Unterschied zu dem homologen Protein aus *Ms. acetivorans* keine Disulfid-Reduktase-Aktivität besitzt.
7. Die Proteine MM0634 und MM0635 besitzen FMN als prosthetische Gruppe. MM0634 koordiniert zusätzlich ein Eisen-Schwefel-Cluster. Für beide Proteine wurde Ferredoxin als nativer Elektronendonator bestimmt.
8. Das Protein MM0636 wurde in *E. coli* produziert und es wurde gezeigt, dass das Protein ein Zwei-Eisen-Zentrum bindet.
9. Das Protein MM0632 wurde mit verschiedenen Enzymtests als Superoxid-Reduktase charakterisiert. Zudem wurde durch biochemische und biophysikalische Analysen der Nachweis erbracht, dass das Protein neben dem [Fe(NHis)₄(SCys)]-Zentrum ein [4Fe-4S]-Cluster bindet. MM0632 gehört somit einer neuen Klasse von Superoxid-Reduktasen mit einem Eisen-Schwefel-Cluster an, die in dieser Arbeit als Methanoferredoxin bezeichnet wurde.
10. Das Desulfiredoxin, MMDx, bindet ein [Fe(SCys)₄]-Zentrum und wurde als nativer Elektronendonator für Methanoferredoxin charakterisiert. Mit einer Oxidoreduktase aus *Clostridium acetobutylicum* sowie Desulfiredoxin und Methanoferredoxin konnte eine NADH abhängige Superoxid-Reduktion nachgewiesen werden.
11. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Proteine MMDx – MM0636 in *Ms. mazei* für die Energiekonservierung nicht von Bedeutung sind. Es wurde jedoch gezeigt, dass viele der hier beschriebenen Proteine in den Schutz der Zelle vor Sauerstoff-Radikalen involviert sind. Die Präsenz von zwei Enzym-Systemen in *Ms. mazei*, die mehrere reaktive Sauerstoffverbindungen entgiften können, zeigt, dass der Organismus sich bis zu einem gewissen Grad vor dem toxischen Einfluss von Sauerstoff in seiner Umgebung schützen kann. Diese Fähigkeit ist für das Überleben der Zellen offensichtlich von entscheidender Bedeutung, da es in den natürlichen Habitaten des anaeroben Archaeons *Ms. mazei* häufig zum Eintrag von Luftsauerstoff kommt.

6. Literaturverzeichnis

1. Abken HJ, Tietze M, Brodersen J, Bäumer S, Beifuss U, Deppenmeier U. 1998. Isolation and characterization of methanophenazine and function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Gö1. *J Bacteriol* 180: 2027-32
2. Abreu IA, Saraiva LM, Carita J, Huber H, Stetter KO, et al. 2000. Oxygen detoxification in the strict anaerobic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*: superoxide scavenging by neelaredoxin. *Mol Microbiol* 38: 322-34
3. Adams MA, Jia Z. 2006. Modulator of drug activity B from *Escherichia coli*: crystal structure of a prokaryotic homologue of DT-diaphorase. *J Mol Biol* 359: 455-65
4. Allen JW, Harvat EM, Stevens JM, Ferguson SJ. 2006. A variant System I for cytochrome *c* biogenesis in *archaea* and some bacteria has a novel CcmE and no CcmH. *FEBS Lett* 580: 4827-34
5. Allen MA, Lauro FM, Williams TJ, Burg D, Siddiqui KS, et al. 2009. The genome sequence of the psychrophilic archaeon, *Methanococcoides burtonii*: the role of genome evolution in cold adaptation. *ISME J* 3: 1012-35
6. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-402
7. Anderson I, Ulrich LE, Lupa B, Susanti D, Porat I, et al. 2009. Genomic characterization of *Methanomicrobiales* reveals three classes of methanogens. *PLoS One* 4: e5797
8. Andrade SL, Cruz F, Drennan CL, Ramakrishnan V, Rees DC, et al. 2005. Structures of the iron-sulfur flavoproteins from *Methanosarcina thermophila* and *Archaeoglobus fulgidus*. *J Bacteriol* 187: 3848-54
9. Andrews SC. 2010. The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor. *Biochim Biophys Acta* 1800: 691-705
10. Arslan E, Schulz H, Zufferey R, Kunzler P, Thony-Meyer L. 1998. Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* *c*-type cytochrome subunits of the *cbb3* oxidase in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 744-7
11. Auchere F, Rusnak F. 2002. What is the ultimate fate of superoxide anion *in vivo*? *J Biol Inorg Chem* 7: 664-7
12. Azzi A, Montecucco C, Richter C. 1975. The use of acetylated ferricytochrome *c* for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 65: 597-603
13. Batista AP, Kletzin A, Pereira MM. 2008. The dihydrolipoamide dehydrogenase from the crenarchaeon *Acidianus ambivalens*. *FEMS Microbiol Lett* 281: 147-54
14. Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44: 276-87
15. Becker DF, Leartsakulpanich U, Surerus KK, Ferry JG, Ragsdale SW. 1998. Electrochemical and spectroscopic properties of the iron-sulfur flavoprotein from *Methanosarcina thermophila*. *J Biol Chem* 273: 26462-9
16. 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: 373-8
17. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340: 783-95
18. Bertrand P, Gayda JP. 1988. A ligand field analysis of the spectroscopic differences between rubredoxin and desulfuredoxin in the reduced state. *Biochim Biophys Acta* 954: 347-50
19. Biegel E, Müller V. 2010. Bacterial Na⁺-translocating ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 18138-42
20. Blaesse M, Kupke T, Huber R, Steinbacher S. 2000. Crystal structure of the peptidyl-cysteine decarboxylase EpiD complexed with a pentapeptide substrate. *EMBO J* 19: 6299-310

21. Blum H, Beier H, Gross HJ. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. In *Electrophoresis*, pp. 93-9
22. Bodegom PM, Scholten JC, Stams AJ. 2004. Direct inhibition of methanogenesis by ferric iron. *FEMS Microbiol Ecol* 49: 261-8
23. Bond DR, Lovley DR. 2002. Reduction of Fe(III) oxide by methanogens in the presence and absence of extracellular quinones. *Environ Microbiol* 4: 115-24
24. Bonomi F, Kurtz DM, Cui XY. 1996. Ferroxidase activity of recombinant *Desulfovibrio vulgaris* rubrerythrin. *J Biol Inorg Chem* 1: 67-72
25. Bose A, Pritchett MA, Metcalf WW. 2008. Genetic analysis of the methanol- and methylamine-specific methyltransferase 2 genes of *Methanosarcina acetivorans* C2A. *J Bacteriol* 190: 4017-26
26. Bose A, Pritchett MA, Rother M, Metcalf WW. 2006. Differential regulation of the three methanol methyltransferase isozymes in *Methanosarcina acetivorans* C2A. *J Bacteriol* 188: 7274-83
27. Brabban AD, Orcutt EN, Zinder SH. 1999. Interactions between nitrogen fixation and osmoregulation in the methanogenic archaeon *Methanosarcina barkeri* 227. *Appl Environ Microbiol* 65: 1222-7
28. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
29. Brioukhanov AL, Netrusov AI. 2004. Catalase and superoxide dismutase: distribution, properties, and physiological role in cells of strict anaerobes. *Biochemistry (Mosc)* 69: 949-62
30. Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P. 2008. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota*. *Nat Rev Microbiol* 6: 245-52
31. Brown OR, Smyk-Randall E, Draczynska-Lusiak B, Fee JA. 1995. Dihydroxy-acid dehydratase, a [4Fe-4S] cluster-containing enzyme in *Escherichia coli*: effects of intracellular superoxide dismutase on its inactivation by oxidant stress. *Arch Biochem Biophys* 319: 10-22
32. Brüggemann H, Falinski F, Deppenmeier U. 2000. Structure of the F₄₂₀H₂:quinone oxidoreductase of *Archaeoglobus fulgidus* identification and overproduction of the F₄₂₀H₂-oxidizing subunit. *Eur J Biochem* 267: 5810-4
33. Brumlik MJ, Leroy G, Bruschi M, Voordouw G. 1990. The nucleotide sequence of the *Desulfovibrio gigas* desulforedoxin gene indicates that the *Desulfovibrio vulgaris* *rbo* gene originated from a gene fusion event. *J Bacteriol* 172: 7289-92
34. Brumlik MJ, Voordouw G. 1989. Analysis of the transcriptional unit encoding the genes for rubredoxin (*rub*) and a putative rubredoxin oxidoreductase (*rbo*) in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J Bacteriol* 171: 4996-5004
35. Bryk R, Lima CD, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nathan C. 2002. Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science* 295: 1073-7
36. Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, et al. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273: 1058-73
37. Burke SA, Krzycki JA. 1997. Reconstitution of Monomethylamine:Coenzyme M methyl transfer with a corrinoid protein and two methyltransferases purified from *Methanosarcina barkeri*. *J Biol Chem* 272: 16570-7
38. Case CL, Rodriguez JR, Mukhopadhyay B. 2009. Characterization of an NADH oxidase of the flavin-dependent disulfide reductase family from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Microbiology* 155: 69-79
39. Cavicchioli R. 2011. *Archaea*-timeline of the third domain. *Nat Rev Microbiol* 9: 51-61
40. Cervantes FJ, de Bok FA, Duong-Dac T, Stams AJ, Lettinga G, Field JA. 2002. Reduction of humic substances by halorespiring, sulphate-reducing and methanogenic microorganisms. *Environ Microbiol* 4: 51-7
41. Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG. 1994. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 269: 27670-8
42. Chen L, Sharma P, Le Gall J, Mariano AM, Teixeira M, Xavier AV. 1994. A blue non-heme iron protein from *Desulfovibrio gigas*. *Eur J Biochem* 226: 613-8

43. Cicchillo RM, Baker MA, Schnitzer EJ, Newman EB, Krebs C, Booker SJ. 2004. *Escherichia coli* L-serine deaminase requires a [4Fe-4S] cluster in catalysis. *J Biol Chem* 279: 32418-25
44. Clay MD, Emerson JP, Coulter ED, Kurtz DM, Jr., Johnson MK. 2003. Spectroscopic characterization of the [Fe(His)₄(Cys)] site in 2Fe-superoxide reductase from *Desulfovibrio vulgaris*. *J Biol Inorg Chem* 8: 671-82
45. Clay MD, Jenney FE, Jr., Hagedoorn PL, George GN, Adams MW, Johnson MK. 2002. Spectroscopic studies of *Pyrococcus furiosus* superoxide reductase: implications for active-site structures and the catalytic mechanism. *J Am Chem Soc* 124: 788-805
46. Cline JD. 1969. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol Oceanogr* 14: 454-8
47. Coelho AV, Matias P, Fülöp V, Gonzalez ATA, Carrondo MA. 1997. Desulfoferrodoxin structure determined by MAD phasing and refinement to 1.9-Å resolution reveals a unique combination of a tetrahedral FeS₄ centre with a square pyramidal FeSN₄ centre. *J Biol Inorg Chem* 2: 680-9
48. Coulter ED, Emerson JP, Kurtz DM, Cabelli DE. 2000. Superoxide reactivity of rubredoxin oxidoreductase (desulfoferrodoxin) from *Desulfovibrio vulgaris*: A pulse radiolysis study. *Journal of the American Chemical Society* 122: 11555-6
49. Coulter ED, Kurtz DM, Jr. 2001. A role for rubredoxin in oxidative stress protection in *Desulfovibrio vulgaris*: catalytic electron transfer to rubrerythrin and two-iron superoxide reductase. *Arch Biochem Biophys* 394: 76-86
50. Coulter ED, Shenvi NV, Kurtz DM, Jr. 1999. NADH peroxidase activity of rubrerythrin. *Biochem Biophys Res Commun* 255: 317-23
51. Crack JC, Green J, Cheesman MR, Le Brun NE, Thomson AJ. 2007. Superoxide-mediated amplification of the oxygen-induced switch from [4Fe-4S] to [2Fe-2S] clusters in the transcriptional regulator FNR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2092-7
52. Cruz F, Ferry JG. 2006. Interaction of iron-sulfur flavoprotein with oxygen and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1760: 858-64
53. Das A, Coulter ED, Kurtz DM, Jr., Ljungdahl LG. 2001. Five-gene cluster in *Clostridium thermoaceticum* consisting of two divergent operons encoding rubredoxin oxidoreductase- rubredoxin and rubrerythrin-type A flavoprotein- high-molecular-weight rubredoxin. *J Bacteriol* 183: 1560-7
54. deMare F, Kurtz DM, Jr., Nordlund P. 1996. The structure of *Desulfovibrio vulgaris* rubrerythrin reveals a unique combination of rubredoxin-like FeS₄ and ferritin-like diiron domains. *Nat Struct Biol* 3: 539-46
55. Deppenmeier U. 2002. Redox-driven proton translocation in methanogenic *Archaea*. *Cell Mol Life Sci* 59: 1513-33
56. Deppenmeier U. 2002. The unique biochemistry of methanogenesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 71: 223-83
57. Deppenmeier U. 2004. The membrane-bound electron transport system of *Methanosarcina* species. *J Bioenerg Biomembr* 36: 55-64
58. Deppenmeier U, Johann A, Hartsch T, Merkl R, Schmitz RA, et al. 2002. The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and archaea. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4: 453-61
59. Ding YH, Ferry JG. 2004. Flavin mononucleotide-binding flavoprotein family in the domain archaea. *J Bacteriol* 186: 90-7
60. Djaman O, Outten FW, Imlay JA. 2004. Repair of oxidized iron-sulfur clusters in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 279: 44590-9
61. Dowden HC. 1938. The determination of small amounts of dimethylamine in biological fluids. *Biochem J* 32: 455-9
62. Ehlers C, Weidenbach K, Veit K, Deppenmeier U, Metcalf WW, Schmitz RA. 2005. Development of genetic methods and construction of a chromosomal *glnK1* mutant in *Methanosarcina mazei* strain Gö1. *Mol Genet Genomics* 273: 290-8
63. Einsle O, Stach P, Messerschmidt A, Simon J, Kroger A, et al. 2000. Cytochrome c nitrite reductase from *Wolinella succinogenes*. Structure at 1.6 Å resolution, inhibitor binding, and heme-packing motifs. *J Biol Chem* 275: 39608-16
64. Emerson JP, Cabelli DE, Kurtz DM, Jr. 2003. An engineered two-iron superoxide reductase lacking the [Fe(SCys)₄] site retains its catalytic properties *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3802-7

65. Farr SB, Kogoma T. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* 55: 561-85
66. Ferguson DJ, Jr., Gorlatova N, Grahame DA, Krzycki JA. 2000. Reconstitution of dimethylamine:coenzyme M methyl transfer with a discrete corrinoid protein and two methyltransferases purified from *Methanosarcina barkeri*. *J Biol Chem* 275: 29053-60
67. Ferguson DJ, Jr., Krzycki JA. 1997. Reconstitution of trimethylamine-dependent coenzyme M methylation with the trimethylamine corrinoid protein and the isozymes of methyltransferase II from *Methanosarcina barkeri*. *J Bacteriol* 179: 846-52
68. Ferguson DJ, Jr., Krzycki JA, Grahame DA. 1996. Specific roles of methylcobamide:coenzyme M methyltransferase isozymes in metabolism of methanol and methylamines in *Methanosarcina barkeri*. *J Biol Chem* 271: 5189-94
69. Ferry JG, Kstead KA. 2007. *Methanogenesis*. Washington DC: ASM Press
70. Fetzter S, Conrad R. 1993. Effect of redox potential on methanogenesis by *Methanosarcina barkeri*. *Arch Microbiol* 160: 108-13
71. Fish WW. 1988. Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol* 158: 357-64
72. Flint DH, Emptage MH, Finnegan MG, Fu W, Johnson MK. 1993. The role and properties of the iron-sulfur cluster in *Escherichia coli* dihydroxy-acid dehydratase. *J Biol Chem* 268: 14732-42
73. Franzmann P, Springer N, Ludwig W, Conway de Macario E, Rohde M. 1992. A methanogenic archaeon from Ace Lake, Antarctica: *Methanococcoides burtonii* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 15: 573-81
74. Friedrich CG, Quentmeier A, Bardischewsky F, Rother D, Kraft R, et al. 2000. Novel genes coding for lithotrophic sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17. *J Bacteriol* 182: 4677-87
75. Galagan JE, Nusbaum C, Roy A, Endrizzi MG, Macdonald P, et al. 2002. The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res* 12: 532-42
76. Gardner PR, Fridovich I. 1991. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J Biol Chem* 266: 1478-83
77. Gardner PR, Fridovich I. 1991. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. *J Biol Chem* 266: 19328-33
78. Gon S, Giudici-Orticoni MT, Mejean V, Iobbi-Nivol C. 2001. Electron transfer and binding of the c-type cytochrome TorC to the trimethylamine N-oxide reductase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276: 11545-51
79. Grandori R, Khalifah P, Boice JA, Fairman R, Giovanielli K, Carey J. 1998. Biochemical characterization of WrbA, founding member of a new family of multimeric flavodoxin-like proteins. *J Biol Chem* 273: 20960-6
80. Green J, Bennett B, Jordan P, Ralph ET, Thomson AJ, Guest JR. 1996. Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch *in vitro*. *Biochem J* 316 (Pt 3): 887-92
81. Gribaldo S, Brochier-Armanet C. 2006. The origin and evolution of *archaea*: a state of the art. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1007-22
82. Grunden AM, Jenney FE, Jr., Ma K, Ji M, Weinberg MV, Adams MW. 2005. In vitro reconstitution of an NADPH-dependent superoxide reduction pathway from *Pyrococcus furiosus*. *Appl Environ Microbiol* 71: 1522-30
83. Gupta N, Bonomi F, Kurtz DM, Jr., Ravi N, Wang DL, Huynh BH. 1995. Recombinant *Desulfovibrio vulgaris* rubrerythrin. Isolation and characterization of the diiron domain. *Biochemistry* 34: 3310-8
84. Hamann N, Mander GJ, Shokes JE, Scott RA, Bennati M, Hedderich R. 2007. A cysteine-rich CCG domain contains a novel [4Fe-4S] cluster binding motif as deduced from studies with subunit B of heterodisulfide reductase from *Methanothermobacter marburgensis*. *Biochemistry* 46: 12875-85
85. Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-80
86. Hendrickson EL, Kaul R, Zhou Y, Bovee D, Chapman P, et al. 2004. Complete genome sequence of the genetically tractable hydrogenotrophic methanogen *Methanococcus maripaludis*. *J Bacteriol* 186: 6956-69

87. Hillas PJ, del Alba FS, Oyarzabal J, Wilks A, Ortiz De Montellano PR. 2000. The AhpC and AhpD antioxidant defense system of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 275: 18801-9
88. Hillmann F, Fischer RJ, Saint-Prix F, Girbal L, Bahl H. 2008. PerR acts as a switch for oxygen tolerance in the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Mol Microbiol* 68: 848-60
89. Hillmann F, Riebe O, Fischer RJ, Mot A, Caranto JD, et al. 2009. Reductive dioxygen scavenging by flavo-diiron proteins of *Clostridium acetobutylicum*. *FEBS Lett* 583: 241-5
90. Hippe H, Caspari D, Fiebig K, Gottschalk G. 1979. Utilization of trimethylamine and other N-methyl compounds for growth and methane formation by *Methanosarcina barkeri*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 494-8
91. Holmgren A. 1979. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem* 254: 9627-32
92. Holmgren A. 1985. Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 54: 237-71
93. Hovey R, Lentjes S, Ehrenreich A, Salmon K, Saba K, et al. 2005. DNA microarray analysis of *Methanosarcina mazei* Gö1 reveals adaptation to different methanogenic substrates. *Mol Genet Genomics* 273: 225-39
94. Ikawa M, Schaper TD, Dollard CA, Sasner JJ. 2003. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J Agric Food Chem* 51: 1811-5
95. Imlay JA. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 57: 395-418
96. Imlay JA, Fridovich I. 1991. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 266: 6957-65
97. Paterek JR, Smith PH. 1988. *Methanohalophilus mahii* gen. nov. sp. nov. a methylotrophic halophilic methanogen. *Int J Syst Bacteriol* 38: 122-3
98. Jäger D, Sharma CM, Thomsen J, Ehlers C, Vogel J, Schmitz RA. 2009. Deep sequencing analysis of the *Methanosarcina mazei* Gö1 transcriptome in response to nitrogen availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21878-82
99. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. 2010. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem* 47: 53-67
100. Jenney FE, Jr., Verhagen MF, Cui X, Adams MW. 1999. Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase. *Science* 286: 306-9
101. Jovanovic T, Ascenso C, Hazlett KR, Sikkink R, Krebs C, et al. 2000. Neelaredoxin, an iron-binding protein from the syphilis spirochete, *Treponema pallidum*, is a superoxide reductase. *J Biol Chem* 275: 28439-48
102. Kalyuzhnaya MG, Korotkova N, Crowther G, Marx CJ, Lidstrom ME, Chistoserdova L. 2005. Analysis of gene islands involved in methanopterin-linked C₁ transfer reactions reveals new functions and provides evolutionary insights. *J Bacteriol* 187: 4607-14
103. Kamlage B, Blaut M. 1992. Characterization of cytochromes from *Methanosarcina* strain Gö1 and their involvement in electron transport during growth on methanol. *J Bacteriol* 174: 3921-7
104. Kamlage B, Blaut M. 1992. Characterization of cytochromes from *Methanosarcina* strain Gö1 and their involvement in electron transport during growth on methanol. *J Bacteriol* 174: 3921-7
105. Kashima Y, Ishikawa K. 2003. Alkyl hydroperoxide reductase dependent on thioredoxin-like protein from *Pyrococcus horikoshii*. *J Biochem* 134: 25-9
106. Keltjens JT, Vogels GD. 1988. Methanopterin and methanogenic bacteria. *Biofactors* 1: 95-103
107. Kern M, Simon J. 2009. Periplasmic nitrate reduction in *Wolinella succinogenes*: cytoplasmic NapF facilitates NapA maturation and requires the menaquinol dehydrogenase NapH for membrane attachment. *Microbiology* 155: 2784-94
108. Kern M, Simon J. 2011. Production of recombinant multiheme cytochromes c in *Wolinella succinogenes*. *Methods Enzymol* 486: 429-46
109. Kiley PJ, Beinert H. 1998. Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiol Rev* 22: 341-52
110. Koshkin A, Knudsen GM, Ortiz De Montellano PR. 2004. Intermolecular interactions in the AhpC/AhpD antioxidant defense system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Biochem Biophys* 427: 41-7

111. Krätzer C, Carini P, Hovey R, Deppenmeier U. 2009. Transcriptional profiling of methyltransferase genes during growth of *Methanosarcina mazei* on trimethylamine. *J Bacteriol* 191: 5108-15
112. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567-80
113. Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. 1986. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 59: 612-9
114. Kuo CF, Mashino T, Fridovich I. 1987. alpha, beta-Dihydroxyisovalerate dehydratase. A superoxide-sensitive enzyme. *J Biol Chem* 262: 4724-7
115. Kupke T. 2001. Molecular characterization of the 4'-phosphopantothencysteine decarboxylase domain of bacterial Dfp flavoproteins. *J Biol Chem* 276: 27597-604
116. Kupke T, Stevanovic S, Sahl HG, Gotz F. 1992. Purification and characterization of EpiD, a flavoprotein involved in the biosynthesis of the lantibiotic epidermin. *J Bacteriol* 174: 5354-61
117. Kurtz DM, Jr., Coulter ED. 2002. The mechanism(s) of superoxide reduction by superoxide reductases *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Inorg Chem* 7: 653-8
118. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
119. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-8
120. Leartsakulpanich U, Antonkine ML, Ferry JG. 2000. Site-specific mutational analysis of a novel cysteine motif proposed to ligate the 4Fe-4S cluster in the iron-sulfur flavoprotein of the thermophilic methanoarchaeon *Methanosarcina thermophila*. *J Bacteriol* 182: 5309-16
121. LeGall J, Liu MY, Gomes CM, Braga V, Pacheco I, et al. 1998. Characterisation of a new rubredoxin isolated from *Desulfovibrio desulfuricans* 27774: definition of a new family of rubredoxins. *FEBS Lett* 429: 295-8
122. LeGall J, Prickril BC, Moura I, Xavier AV, Moura JJ, Huynh BH. 1988. Isolation and characterization of rubrerythrin, a non-heme iron protein from *Desulfovibrio vulgaris* that contains rubredoxin centers and a hemerythrin-like binuclear iron cluster. *Biochemistry* 27: 1636-42
123. Lessner DJ, Ferry JG. 2007. The archaeon *Methanosarcina acetivorans* contains a protein disulfide reductase with an iron-sulfur cluster. *J Bacteriol* 189: 7475-84
124. Li L, Li Q, Rohlin L, Kim U, Salmon K, et al. 2007. Quantitative proteomic and microarray analysis of the archaeon *Methanosarcina acetivorans* grown with acetate versus methanol. *J Proteome Res* 6: 759-71
125. Li Q, Li L, Rejtar T, Lessner DJ, Karger BL, Ferry JG. 2006. Electron transport in the pathway of acetate conversion to methane in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *J Bacteriol* 188: 702-10
126. Liu MY, Le Gall J. 1990. Purification and characterization of two proteins with inorganic pyrophosphatase activity from *Desulfovibrio vulgaris*: rubrerythrin and a new, highly active, enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 171: 313-8
127. Lombard M, Fontecave M, Touati D, Niviere V. 2000. Reaction of the desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide anion. Evidence for a superoxide reductase activity. *J Biol Chem* 275: 115-21
128. Lovenberg W, Sobel BE. 1965. Rubredoxin: a new electron transfer protein from *Clostridium pasteurianum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54: 193-9
129. Lumpio HL, Shenvi NV, Summers AO, Voordouw G, Kurtz DM, Jr. 2001. Rubrerythrin and rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: a novel oxidative stress protection system. *J Bacteriol* 183: 101-8
130. Maeder DL, Anderson I, Brettin TS, Bruce DC, Gilna P, et al. 2006. The *Methanosarcina barkeri* genome: comparative analysis with *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina mazei* reveals extensive rearrangement within Methanosarcinal genomes. *J Bacteriol* 188: 7922-31
131. Mah RA, Kuhn DA. 1984. Transfer of the type species of the genus *Methanococcus* to the genus *Methanosarcina*, naming it *Methanosarcina mazei* (Barker 1936) Comb nov et emend and conservation of the genus *Methanococcus* (Approved lists 1980) with *Methanococcus vannielii* (Approved lists 1980) as the type species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34: 263-5

132. Major TA, Burd H, Whitman WB. 2004. Abundance of 4Fe-4S motifs in the genomes of methanogens and other prokaryotes. *FEMS Microbiol Lett* 239: 117-23
133. Marnett LJ. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21: 361-70
134. Massey V. 1994. Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J Biol Chem* 269: 22459-62
135. McCord JM, Fridovich I. 1968. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 243: 5753-60
136. McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-55
137. McCord JM, Fridovich I. 1970. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *J Biol Chem* 245: 1374-7
138. McCrindle SL, Kappler U, McEwan AG. 2005. Microbial dimethylsulfoxide and trimethylamine-N-oxide respiration. *Adv Microb Physiol* 50: 147-98
139. 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: 325-35
140. Meuer J, Kuettner HC, Zhang JK, Hedderich R, Metcalf WW. 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: 5632-7
141. Miller JR, ed. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press
142. Mortenson LE. 1964. Purification and analysis of ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects* 81: 71-7
143. Mott JE, Grant RA, Ho YS, Platt T. 1985. Maximizing gene expression from plasmid vectors containing the lambda PL promoter: strategies for overproducing transcription termination factor rho. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 88-92
144. Moura I, Tavares P, Moura JJ, Ravi N, Huynh BH, et al. 1990. Purification and characterization of desulfoferredoxin. A novel protein from *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774) and from *Desulfovibrio vulgaris* (strain Hildenborough) that contains a distorted rubredoxin center and a mononuclear ferrous center. *J Biol Chem* 265: 21596-602
145. Moura I, Tavares P, Ravi N. 1994. Characterization of three proteins containing multiple iron sites: rubrerythrin, desulfoferredoxin, and a protein containing a six-iron cluster. *Methods Enzymol* 243: 216-40
146. Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-50
147. Ni S, Woese CR, Aldrich HC, Boone DR. 1994. Transfer of *Methanobrevibacterium* *siciliae* to the genus *Methanosarcina*, naming it *Methanosarcina siciliae*, and emendation of the genus *Methanosarcina*. *Int J Syst Bacteriol* 44: 357-9
148. Oremland RS, Boone DR. 1994. *Methanobrevibacterium taylorii* sp. nov., a new Methylophilic, estuarine methanogen *Int J Syst Bacteriol* 44: 573-5
149. Oremland RS, Polcin S. 1982. Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol* 44: 1270-6
150. Pan N, Imlay JA. 2001. How does oxygen inhibit central metabolism in the obligate anaerobe *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Mol Microbiol* 39: 1562-71
151. Papadopoulos JS, Agarwala R. 2007. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* 23: 1073-9
152. Patridge EV, Ferry JG. 2006. WrbA from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* is an NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *J Bacteriol* 188: 3498-506
153. Paul L, Ferguson DJ, Jr., Krzycki JA. 2000. The trimethylamine methyltransferase gene and multiple dimethylamine methyltransferase genes of *Methanosarcina barkeri* contain in-frame and read-through amber codons. *J Bacteriol* 182: 2520-9
154. Pfennig N, Lippert KD. 1966. Über das Vitamin B₁₂-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Arch Microbiol* 55
155. Pflüger K, Ehrenreich A, Salmon K, Gunsalus RP, Deppenmeier U, et al. 2007. Identification of genes involved in salt adaptation in the archaeon *Methanosarcina*

- mazei* Gö1 using genome-wide gene expression profiling. *FEMS Microbiol Lett* 277: 79-89
156. Pieulle L, Magro V, Hatchikian EC. 1997. Isolation and analysis of the gene encoding the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase of *Desulfovibrio africanus*, production of the recombinant enzyme in *Escherichia coli*, and effect of carboxy-terminal deletions on its stability. *J Bacteriol* 179: 5684-92
 157. Pinto AF, Rodrigues JV, Teixeira M. 2010. Reductive elimination of superoxide: Structure and mechanism of superoxide reductases. *Biochim Biophys Acta* 1804: 285-97
 158. Pohlschroder M, Gimenez MI, Jarrell KF. 2005. Protein transport in *Archaea*: Sec and twin arginine translocation pathways. *Curr Opin Microbiol* 8: 713-9
 159. Poole LB, Ellis HR. 1996. Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC proteins. *Biochemistry* 35: 56-64
 160. Pritchett MA, Metcalf WW. 2005. Genetic, physiological and biochemical characterization of multiple methanol methyltransferase isozymes in *Methanosarcina acetivorans* C2A. *Mol Microbiol* 56: 1183-94
 161. Ragsdale SW, Ljungdahl LG, DerVartanian DV. 1983. Isolation of carbon monoxide dehydrogenase from *Acetobacterium woodii* and comparison of its properties with those of the *Clostridium thermoaceticum* enzyme. *J Bacteriol* 155: 1224-37
 162. Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. 2009. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1760-5
 163. Riebe O, Fischer RJ, Bahl H. 2007. Desulfoferredoxin of *Clostridium acetobutylicum* functions as a superoxide reductase. *FEBS Lett* 581: 5605-10
 164. Riebe O, Fischer RJ, Wampler DA, Kurtz DM, Jr., Bahl H. 2009. Pathway for H₂O₂ and O₂ detoxification in *Clostridium acetobutylicum*. *Microbiology* 155: 16-24
 165. Rodrigues JV, Abreu IA, Saraiva LM, Teixeira M. 2005. Rubredoxin acts as an electron donor for neelaredoxin in *Archaeoglobus fulgidus*. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 1300-5
 166. Rodriguez-Manzanegue MT, Tamarit J, Belli G, Ros J, Herrero E. 2002. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell* 13: 1109-21
 167. Roessler M, Pflüger K, Flach H, Lienard T, Gottschalk G, Müller V. 2002. Identification of a salt-induced primary transporter for glycine betaine in the methanogen *Methanosarcina mazei* Gö1. *Appl Environ Microbiol* 68: 2133-9
 168. Rusnak F, Ascenso C, Moura I, Moura JJ. 2002. Superoxide reductase activities of neelaredoxin and desulfoferredoxin metalloproteins. *Methods Enzymol* 349: 243-58
 169. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, eds. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2. Ausgabe. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory
 170. Sanders C, Turkarlan S, Lee DW, Daldal F. 2010. Cytochrome c biogenesis: the Ccm system. *Trends Microbiol* 18: 266-74
 171. Santos-Silva T, Trincao J, Carvalho AL, Bonifacio C, Auchere F, et al. 2006. The first crystal structure of class III superoxide reductase from *Treponema pallidum*. *J Biol Inorg Chem* 11: 548-58
 172. Schlegel HG. 1992. Allgemeine Mikrobiologie 7. Auflage. *Thieme Verlag, Stuttgart*.
 173. Scholten JC, Culley DE, Nie L, Munn KJ, Chow L, et al. 2007. Development and assessment of whole-genome oligonucleotide microarrays to analyze an anaerobic microbial community and its responses to oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 571-7
 174. Seaver LC, Imlay JA. 2001. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 7173-81
 175. Seedorf H, Dreisbach A, Hedderich R, Shima S, Thauer RK. 2004. F₄₂₀H₂ oxidase (FprA) from *Methanobrevibacter arboriphilus*, a coenzyme F₄₂₀-dependent enzyme involved in O₂ detoxification. *Arch Microbiol* 182: 126-37
 176. Seedorf H, Hagemeyer CH, Shima S, Thauer RK, Warkentin E, Ermler U. 2007. Structure of coenzyme F₄₂₀H₂ oxidase (FprA), a di-iron flavoprotein from methanogenic *Archaea* catalyzing the reduction of O₂ to H₂O. *FEBS J* 274: 1588-99

177. Shaw AL, Leimkuhler S, Klipp W, Hanson GR, McEwan AG. 1999. Mutational analysis of the dimethylsulfoxide respiratory (*dsr*) operon of *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology* 145 (Pt 6): 1409-20
178. Silaghi-Dumitrescu R, Coulter ED, Das A, Ljungdahl LG, Jameson GN, et al. 2003. A flavodiiron protein and high molecular weight rubredoxin from *Moorella thermoacetica* with nitric oxide reductase activity. *Biochemistry* 42: 2806-15
179. Simon J, Gross R, Einsle O, Kroneck PM, Kröger A, Klimmek O. 2000. A NapC/NirT-type cytochrome *c* (NrfH) is the mediator between the quinone pool and the cytochrome *c* nitrite reductase of *Wolinella succinogenes*. *Mol Microbiol* 35: 686-96
180. Smith DR, Doucette-Stamm LA, Deloughery C, Lee H, Dubois J, et al. 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol* 179: 7135-55
181. Smith KS, Ingram-Smith C. 2007. *Methanosaeta*, the forgotten methanogen? *Trends Microbiol* 15: 150-5
182. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, et al. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85
183. Sowers KR, Baron SF, Ferry JG. 1984. *Methanosarcina acetivorans* sp. nov., an Acetotrophic Methane-Producing Bacterium Isolated from Marine Sediments. *Appl Environ Microbiol* 47: 971-8
184. Sowers RK, Gunsalus RP. 1988. Adaptation for growth at various saline concentrations by the archaeobacterium *Methanosarcina thermophila*. *J bacteriol*: 998-1002
185. Spiro S, Guest JR. 1990. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* 6: 399-428
186. Spring S, Scheuner C, Lapidus A, Lucas S, Glavina Del Rio T, et al. 2010. The genome sequence of *Methanohalophilus mahii* SLP(T) reveals differences in the energy metabolism among members of the *Methanosarcinaceae* inhabiting freshwater and saline environments. *Archaea* 2010: 690737
187. Stadtman ER, Levine RL. 2000. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 899: 191-208
188. Stetter KO, Gaag G. 1983. Reduction of molecular sulphur by methanogenic bacteria. *Nature* 305: 309-11
189. Stevens JM, Uchida T, Daltrop O, Ferguson SJ. 2005. Covalent cofactor attachment to proteins: cytochrome *c* biogenesis. *Biochem Soc Trans* 33: 792-5
190. Tavares P, Ravi N, Moura JJ, LeGall J, Huang YH, et al. 1994. Spectroscopic properties of desulfoferrodoxin from *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774). *J Biol Chem* 269: 10504-10
191. Terlesky KC, Nelson MJ, Ferry JG. 1986. Isolation of an enzyme complex with carbon monoxide dehydrogenase activity containing corrinoid and nickel from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *J Bacteriol* 168: 1053-8
192. Tholen A, Pester M, Brune A. 2007. Simultaneous methanogenesis and oxygen reduction by *Methanobrevibacter cuticularis* at low oxygen fluxes. *FEMS Microbiol Ecol* 62: 303-12
193. Thöny-Meyer L. 1997. Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 337-76
194. Tong WH, Jameson GN, Huynh BH, Rouault TA. 2003. Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9762-7
195. Veit K, Ehlers C, Ehrenreich A, Salmon K, Hovey R, et al. 2006. Global transcriptional analysis of *Methanosarcina mazei* strain Gö1 under different nitrogen availabilities. *Mol Genet Genomics* 276: 41-55
196. Vicente JB, Carrondo MA, Teixeira M, Frazao C. 2008. Structural studies on flavodiiron proteins. *Methods Enzymol* 437: 3-19
197. Wakagi T. 2003. Sulerythrin, the smallest member of the rubrerythrin family, from a strictly aerobic and thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *FEMS Microbiol Lett* 222: 33-7
198. Wang HY, Liua LD, Renb JC. 1999. Determination of methyl isocyanate in air by fluorimetry. *Analyst* 124: 1327-30
199. Weinberg MV, Jenney FE, Jr., Cui X, Adams MW. 2004. Rubrerythrin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is a rubredoxin-dependent, iron-containing peroxidase. *J Bacteriol* 186: 7888-95

200. Welte C, Deppenmeier U. 2011. Re-evaluation of the function of the F₄₂₀ dehydrogenase in electron transport of *Methanosarcina mazei*. *FEBS J*, in press
201. Welte C, Krätzer C, Deppenmeier U. 2010. Involvement of Ech hydrogenase in energy conservation of *Methanosarcina mazei*. *FEBS J*: 277: 3396-403
202. Woese CR, Fox GE. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5088-90
203. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4576-9
204. Yang W, Ni L, Somerville RL. 1993. A stationary-phase protein of *Escherichia coli* that affects the mode of association between the trp repressor protein and operator-bearing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5796-800
205. Yeh AP, Hu Y, Jenney FE, Jr., Adams MW, Rees DC. 2000. Structures of the superoxide reductase from *Pyrococcus furiosus* in the oxidized and reduced states. *Biochemistry* 39: 2499-508
206. Zhang W, Culley DE, Nie L, Brockman FJ. 2006. DNA microarray analysis of anaerobic *Methanosarcina barkeri* reveals responses to heat shock and air exposure. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 784-90
207. Zhao T, Cruz F, Ferry JG. 2001. Iron-sulfur flavoprotein (Isf) from *Methanosarcina thermophila* is the prototype of a widely distributed family. *J Bacteriol* 183: 6225-33
208. Zhilina TN, Zavarzin GA. 1988. *Methanohalobium evestigatus*, n. gen., n. sp. the extremely halophilic methanogenic archaeobacterium. *Int J Syst Bacteriol* 38: 136-7

Publikationsliste

- Poster „Acetate metabolism in *Methanosarcina mazei*“
Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und
Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Bochum, 2009
- Vortrag „Characterization of methanoferrodoxin: a novel superoxide
reductase“ Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und
Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Hannover, 2010
- Veröffentlichungen Welte C., Hafner S., **Krätzer C.**, Quentmeier A. T., Friedrich
C. G. & Dahl C. (2009) Interaction between Sox proteins of
two physiologically distinct bacteria and a new protein
involved in thiosulfate oxidation. FEBS Lett. 583, 1281-1286.
- Krätzer C.**, Carini P, Hovey R, Deppenmeier
U. (2009) Transcriptional profiling of methyltransferase
genes during growth of *Methanosarcina mazei* on
trimethylamine. J. Bacteriol. 191, 5108-5115.
- Welte C., **Krätzer C.**, Deppenmeier U. (2010) Involvement of
Ech hydrogenase in energy conservation of *Methanosarcina
mazei*. FEBS J. 277, 3396-3403.
- Krätzer C.**, Welte C., Dörner K., Friedrich T., Deppenmeier
U. (2011) Methanoferrodoxin represents a new class of
superoxide reductase containing an iron-sulfur cluster.
FEBS J. 278, 442–451.