

**Energiekonservierung in acetogenen Bakterien:  
die Caffeatreduktion in *Acetobacterium woodii***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich Biowissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Frank Imkamp**  
aus Rosenheim

Frankfurt, Mai 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Volker Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Brandt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.9.2006

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>i</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1. Stoffwechselphysiologie acetogener Bakterien: der Wood-Ljungdahl-Weg</b>	<b>1</b>
<b>2. Die Bioenergetik des Wood-Ljungdahl-Weges</b>	<b>5</b>
2.1 Energiekonservierung in „H <sup>+</sup> -abhängigen“ acetogenen Bakterien	5
2.2 Energiekonservierung in „Na <sup>+</sup> -abhängigen“ acetogenen Bakterien	7
<b>3. Nutzung alternativer Elektronenakzeptoren und daran gekoppelte Mechanismen der Energiekonservierung</b>	<b>8</b>
3.1 Alternative Elektronenakzeptoren bei acetogenen Bakterien	8
3.2 Energiekonservierung im Zuge der Nutzung alternativer terminaler Elektronenakzeptoren	10
<b>4. Fragestellung der Arbeit</b>	<b>12</b>
<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
<b>1. Organismen, Plasmide, Oligonukleotide</b>	<b>14</b>
<b>2. Nährmedien und Supplemente</b>	<b>16</b>
2.1 Phosphat/Carbonat-gepuffertes Komplexmedium für Anzuchten von <i>Acetobacterium woodii</i> (Braun und Gottschalk, 1981; modifiziert)	16
2.2 Nährmedium für <i>Escherichia coli</i>	18
2.3 Nährmedium für <i>Clostridium pasteurianum</i>	18
<b>3. Zellanzucht</b>	<b>18</b>
3.1 Anaerobe Anzucht von <i>A. woodii</i>	19
3.1.1 Anzucht von <i>A. woodii</i> zur Herstellung von Zellsuspensionen	19
3.1.2 Anzucht von <i>A. woodii</i> zur Herstellung zellfreier Rohextrakte	19
3.1.3 Bestimmung der Zelldichte	20
3.1.4 Reinheitskontrolle	20
3.1.5 Stammkulturen	20
3.2 Anzucht von <i>E. coli</i>	20
3.2.1 Stammkulturen	20
3.3 Anaerobe Anzucht von <i>Clostridium pasteurianum</i>	21

---

3.4	Herstellung von Zellsuspensionen von <i>A. woodii</i>	21
3.5	Versuche mit Zellsuspensionen	22
<b>4.</b>	<b>Herstellung zellfreier Rohextrakte (Heise, 1992; modifiziert)</b>	<b>22</b>
4.1	Präparation der cytoplasmatischen Fraktion und gewaschener Membranen	23
4.2	Versuche mit zellfreien Extrakten, Cytoplasma- und Membranfraktion	24
4.2.1	Versuche zur Caffeatreduktion	24
4.2.2	Durchführung photometrischer Enzym-Tests	24
4.2.2.1	Hydrogenase	25
4.2.2.2	NADH-oxidierende Aktivität	26
4.2.2.3	Ferredoxin-NAD <sup>+</sup> -Oxidoreduktase	27
<b>5.</b>	<b>Bestimmung der Konzentration von Phenylacrylaten</b>	<b>27</b>
<b>6.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>28</b>
6.1	Standardmethoden	28
6.2	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>A. woodii</i>	28
6.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis <i>et al.</i> , 1986)	29
6.4	Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von Nukleinsäure-Lösungen	30
6.5	Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarosegelelektrophorese	30
6.6	DNA-DNA-Hybridisierung	31
6.6.1	DNA-Sondenmarkierung mit Digoxigenin-11-dUTP (DIG)	31
6.6.2	Übertragung von Nukleinsäuren auf Nylon-Membranen durch Vakuumblot (Peferoen <i>et al.</i> , 1982)	32
6.6.3	Hybridisierung von Nukleinsäuren mit DIG-markierten DNA-Sonden	33
6.6.4	Die Detektion DIG-markierter DNA-Fragmente	34
<b>7.</b>	<b>Biochemische und Proteinanalytische Methoden</b>	<b>35</b>
7.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	35
7.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
7.3	2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
7.4	Massenspektrometrie	38
7.5	Expression von <i>malE</i> -Fusionsgenen und Aufreinigung von MalE-Fusionsproteinen	38
7.6	Isolierung von Ferredoxin aus <i>Clostridium pasteurianum</i> und <i>Clostridium tetanomorphum</i>	39
<b>8.</b>	<b>Immunologische Methoden</b>	<b>40</b>
8.1	Herstellung polyklonaler Antiseren	40
8.2	Western-Blot	40

---

<b>9. Chemikalien und Gase</b>	<b>42</b>
<b>Experimente und Ergebnisse</b>	<b>43</b>
<b>1. Untersuchungen zur H<sub>2</sub>-abhängigen Caffeatreduktion in zellfreien Systemen</b>	<b>43</b>
1.1 H <sub>2</sub> -abhängige Caffeatreduktion in zellfreiem Rohextrakt	43
1.2 Die zelluläre Lokalisation der H <sub>2</sub> -abhängigen Caffeatreduktion	47
1.3 Alternative Elektronendonatoren für die Caffeatreduktion im zellfreien System	48
<b>2. Identifizierung und Charakterisierung von EtfA und EtfB</b>	<b>51</b>
2.1 Klonierung von <i>etfA</i> und <i>etfB</i>	53
2.2 Untersuchung der genetischen Organisation von <i>etfA</i> und <i>etfB</i>	55
2.3 Analyse der Sequenzdaten von <i>etfA</i> und <i>etfB</i>	57
<b>3. Die Bildung von NADH im Zuge H<sub>2</sub>-abhängiger Caffeatreduktion</b>	<b>60</b>
3.1 Untersuchungen zur Hydrogenase-Aktivität in <i>A. woodii</i>	60
3.2 Elektronendonator:NAD <sup>+</sup> -Oxidoreduktase	62
3.2.1 Die Verteilung der Aktivität in <i>A. woodii</i>	62
3.2.2 Untersuchung der Na <sup>+</sup> -Abhängigkeit der membranständigen NADH-oxidierenden Aktivität in <i>A. woodii</i>	66
3.2.3 Die Hemmung der membranständigen NADH-oxidierenden Aktivität durch Ag <sup>+</sup>	68
3.2.4 Untersuchung der membranständigen Ferredoxin-NAD <sup>+</sup> -Oxidoreduktase-Aktivität in <i>A. woodii</i>	70
3.2.5 Der Einfluß von Ag <sup>+</sup> auf die Ferredoxin-NAD <sup>+</sup> -Oxidoreduktase-Aktivität	73
<b>4. Induktion und Spezifität des Phenylacrylat-Reduktionssystems in <i>A. woodii</i></b>	<b>75</b>
4.1 Nachweis eines universellen Phenylacrylat-Reduktionssystems	75
4.2 Immunologischer Nachweis der Induktion von EtfA und EtfB	77
4.2.1 Herstellung spezifischer Antiseren gegen EtfA und EtfB aus <i>A. woodii</i>	77
4.2.2 Analyse der Induktion von EtfA und EtfB durch Phenylacrylate und strukturell ähnliche Verbindungen	79
4.2.3 Die Induktion von EtfA und EtfB durch Caffeat bei Wachstum auf verschiedenen Substraten	82

---

<b>Diskussion</b>	<b>84</b>
<b>1. Die Nutzung alternativer terminaler Elektronenakzeptoren bei acetogenen Bakterien - Die Regulation des Elektronenflusses</b>	<b>84</b>
<b>2. Mechanismen der Generierung eines transmembranen Na<sup>+</sup>-Potentials im Zuge der H<sub>2</sub>-abhängigen Caffeatreduktion in <i>A. woodii</i></b>	<b>86</b>
2.1 Ionen-translozierden NADH-Dehydrogenasen	87
2.2 Die mögliche Rolle einer Ferredoxin-NAD <sup>+</sup> -Oxidoreduktase (FNOR) bei der H <sub>2</sub> -abhängigen Caffeatreduktion in <i>A. woodii</i>	91
<b>3. Elektronentransfer-Flavoproteine als Mediatoren von Redoxreaktionen</b>	<b>93</b>
<b>4. Betrachtungen zur Caffeat-reduzierenden Aktivität in <i>A. woodii</i></b>	<b>97</b>
<b>5. Die Phenylacrylat-Reduktion in <i>A. woodii</i> – ein Arbeitsmodell</b>	<b>101</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>105</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>108</b>
<b>Anhang</b>	<b>120</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
demin.	demineralisiert
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTE	Dithiotreit
DTT	Dithiotreitol
E <sub>x</sub>	Extinktion bei einer Wellenlänge von x nm
<i>et al.</i>	<i>et alteris</i> (und andere)
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktosid
kDa	Kilodalton
min	Minute
nm	Nanometer
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x nm Wellenlänge
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
psi	„pounds per square inch“
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	-fache Erdbeschleunigung

## Einleitung

### 1. Stoffwechselphysiologie acetogener Bakterien: der Wood-Ljungdahl-Weg

In der Gruppe der acetogenen Bakterien werden anaerobe Prokaryonten zusammengefasst, die  $\text{CO}_2$  als terminalen Elektronenakzeptor nutzen können und dabei Acetat als Stoffwechselendprodukt bilden. Der reduktive Stoffwechselweg, der diese Form der Acetogenese ermöglicht, wird als Acetyl-CoA- oder Wood-Ljungdahl-Weg bezeichnet und grenzt diese Bakterien von Organismen ab, die Acetat nicht durch die Reduktion von  $\text{CO}_2$  bilden.

Die Acetatbildung durch  $\text{CO}_2$ -Reduktion fand erstmals 1932 in der Literatur Erwähnung. FISCHER *et al.* (1932) beschrieben dabei die  $\text{H}_2$ -abhängige Reduktion von  $\text{CO}_2$  zu Acetat durch Mikroorganismen in Abwässern. Mit *Clostridium aceticum* und *Clostridium thermoaceticum* wurden nachfolgend erstmalig acetogene Bakterien isoliert und charakterisiert (Wieringa, 1939-1940; Fontaine *et al.*, 1942). Gegenwärtig werden 21 Gattungen zu den Acetogenen gerechnet (Drake *et al.*, 2004), darunter *Moorella* (mit Vertretern wie *Moorella thermoacetica* [früher: *Clostridium thermoaceticum*; Fontaine *et al.*, 1942], *Moorella thermoautotrophicum* [früher: *Clostridium thermoautotrophicum*; Wiegel *et al.*, 1981]), *Ruminococcus* (z. B. *Ruminococcus productus* [früher: *Peptostreptococcus productus*; Lorowitz und Bryant, 1984]), *Sporomusa* (z. B. *Sporomusa ovata*; Möller *et al.*, 1984) und *Acetobacterium* (z. B. *Acetobacterium woodii*; Balch *et al.*, 1977).

Die ersten isolierten acetogenen Bakterien wurden noch ausschliesslich als autotroph-wachsende bzw. Hexose-verwertende Bakterien charakterisiert. In den letzten Jahren zeigte sich aber, dass diese Gruppe von Organismen stoffwechselphysiologisch äusserst vielseitig ist. Neben Einkohlenstoffverbindungen wie Formiat oder CO können acetogene Bakterien auf Alkoholen (z. B. Methanol, Ethanol, Glyzerin), Aldehyden (z.B. Glyoxylat, Benzaldehyd), Carbonsäuren (z. B. Pyruvat, Laktat), Methylgruppen methoxylierter, aromatischer Verbindungen (z. B. 3,4,5-Trimethoxycinnamat, Sinapat, Ferulat) und zahlreichen Hexosen als Kohlenstoff-Quelle wachsen (Drake *et al.*, 2004). Im Folgenden soll die chemoorganotrophe Lebensweise am Beispiel der Hexosen erläutert werden.

Acetogene Bakterien verstoffwechseln Hexosen über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Abb. 1). Das entstehende Pyruvat wird im weiteren Verlauf durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA und  $\text{CO}_2$  oxidiert, wobei reduziertes Ferredoxin entsteht.

Acetyl-CoA wird anschliessend über Acetyl-Phosphat zu Acetat umgewandelt, wobei im Zuge der Acetatkinase-Reaktion ein Mol ATP entsteht (Schaupp und Ljungdahl, 1974; Drake *et al.*, 1981). Pro Mol Hexose werden also zwei Mol Acetat, 2 Mol CO<sub>2</sub> und vier Reduktionsäquivalente sowie durch Substratkettenphosphorylierung vier Mol ATP gebildet:

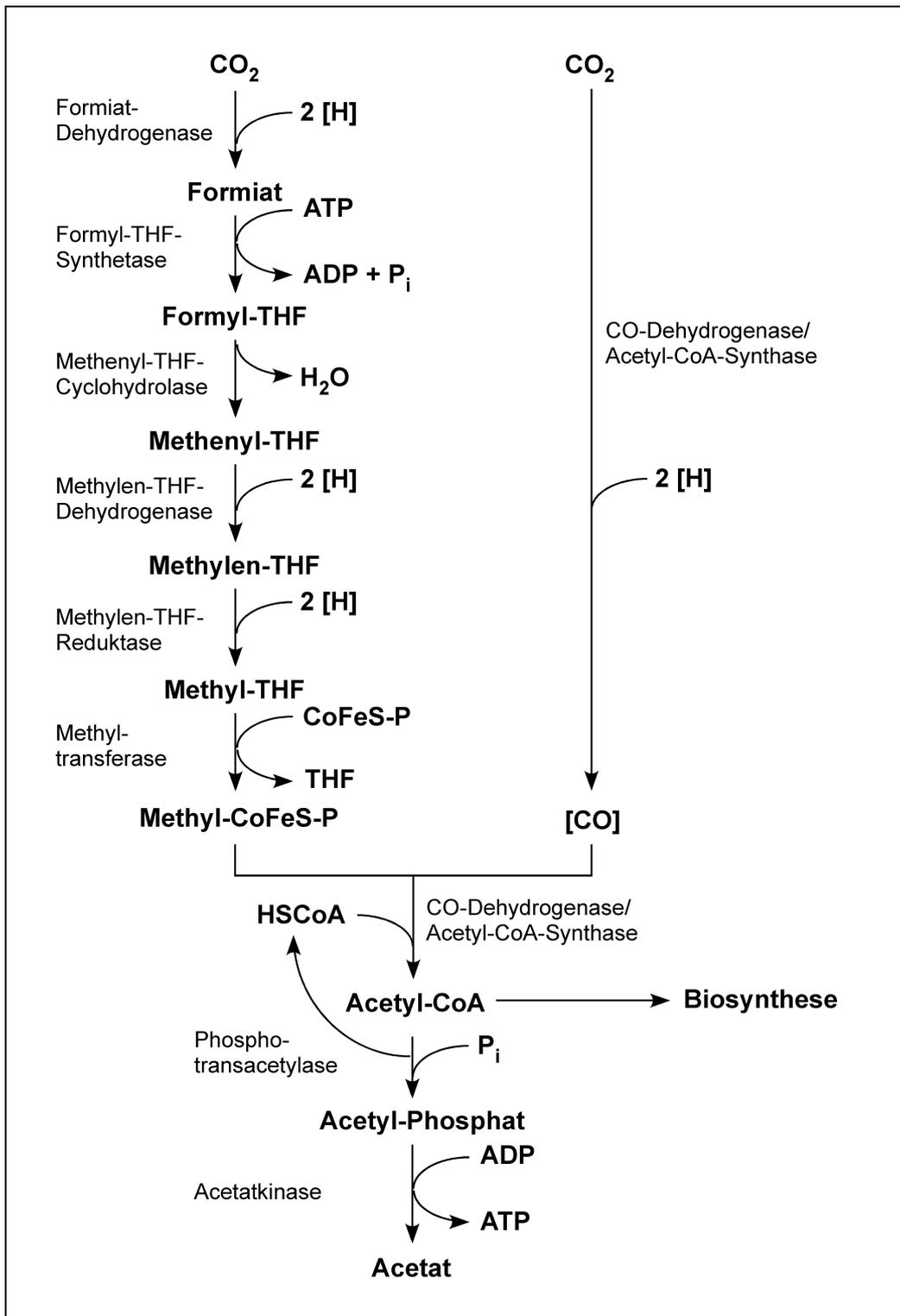


Das freigesetzte CO<sub>2</sub> ist kein Endprodukt des acetogenen Stoffwechsels, sondern fungiert als terminaler Elektronenakzeptor und wird mittels der im Embden-Meyerhof-Parnas-Weg und bei der Spaltung des Pyruvats zu Acetyl-CoA und CO<sub>2</sub> entstehenden Reduktionsäquivalente im „Wood-Ljungdahl“-Weg zu einem weiteren Mol Acetat reduziert.

**Abb. 1. Schema der Verwertung von Hexosen durch acetogene Bakterien.** [H] entspricht 1 e<sup>-</sup>.

Die Reaktionsschritte des Wood-Ljungdahl-Weges und die daran beteiligten Enzyme wurden im Wesentlichen in dem Modellorganismus *Moorella thermoacetica* untersucht und charakterisiert (Abb. 2). Im ersten Schritt des Weges wird CO<sub>2</sub> durch eine NADP<sup>+</sup>-abhängige

Formiatdehydrogenase zu Formiat reduziert. Das Enzym, das diese reversible Reaktion katalysiert, ist in *M. thermoacetica* ein  $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer, das neben Eisen-Schwefel-Zentren Wolfram und Selen enthält (Yamamoto *et al.*, 1983). Im Folgenden wird das freie Intermediat Formiat durch die Formyl-Tetrahydrofolat-Synthetase auf den C<sub>1</sub>-Überträger Tetrahydrofolat übertragen (Lovell *et al.*, 1988, 1990). Die Bildung von Formyl-Tetrahydrofolat ist endergon und wird durch die Hydrolyse von ATP getrieben. An Tetrahydrofolat gebunden wird die Formyl-Gruppe sukzessive zu einer Methyl-Gruppe reduziert, welche die Vorstufe der Methyl-Gruppe des Acetats darstellt. Im Folgenden überträgt eine Methyltransferase den Methyl-Rest auf ein Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein (Drake *et al.*, 1981; Ragsdale *et al.*, 1987; Roberts *et al.*, 1989; Wirt *et al.*, 1995; Seravalli *et al.*, 1999a, 1999b; Banerjee und Ragsdale, 2003). Dieses methyliert die CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase (CODH/ACS), das Schlüsselenzym des Wood-Ljungdahl-Weges (Diekert und Thauer, 1978; Hu *et al.*, 1984). Das bifunktionale Enzym ist ein  $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer (Ragsdale *et al.*, 1983; Doukov *et al.*, 2002; Darnault *et al.*, 2003; Grahame, 2003). Die Synthese von Acetyl-CoA aus CoA, der gebundenen Methyl-Gruppe und CO wird durch die  $\alpha$ -Untereinheit katalysiert. Die Reduktion von CO<sub>2</sub> an der  $\beta$ -Untereinheit liefert das dafür benötigte CO, welches die Vorstufe der Carbonyl-Gruppe des Acetyl-CoA darstellt (Pezacka und Wood, 1984a, b; Raybuck *et al.*, 1988; Ragsdale und Kumar, 1996; Barondeau und Lindahl, 1997; Seravalli *et al.*, 1997). Acetyl-CoA dient entweder als Kohlenstoffquelle für anabole Prozesse oder wird über Acetyl-Phosphat zu Acetat umgesetzt (Eden und Fuchs, 1982).



**Abb. 2. Der Wood-Ljungdahl-Weg.** THF, Tetrahydrofolat; CoFeS-P, Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein; [H] entspricht 1 e<sup>-</sup>; (nach Müller *et al.*, 2004).

## 2. Die Bioenergetik des Wood-Ljungdahl-Weges

Bei chemolithoautotrophen Wachstum nach der Umsatzgleichung  $4 \text{ H}_2 + 2 \text{ CO}_2 \rightarrow \text{Acetat}$  ( $\Delta G^0 = -95 \text{ kJ/mol}$ ) nutzen acetogene Bakterien ausschließlich den Wood-Ljungdahl-Weg. Wie aus Abb. 2 ersichtlich, erfolgt im Zuge dieses Stoffwechselweges allerdings keine Netto-ATP-Synthese durch Substratkettenphosphorylierung. Das durch die Acetatkinase-Reaktion gewonnene ATP wird bei der Aktivierung des Formiats wieder verbraucht. ATP-Synthese kann daher bei Wachstum mit  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$  nur durch chemiosmotische Prozesse erfolgen. Hinsichtlich der Mechanismen der Energiekonservierung durch chemiosmotische Prozesse können bei acetogenen Bakterien „ $\text{H}^+$ -abhängige“ und „ $\text{Na}^+$ -abhängige“ Organismen unterschieden werden.

### 2.1 Energiekonservierung in „ $\text{H}^+$ -abhängigen“ acetogenen Bakterien

Stellvertretend für die Gruppe der „ $\text{H}^+$ -abhängigen“ acetogenen Bakterien steht *M. thermoacetica*. BARONOFSKY *et al.* (1984) konnten bei diesem Acetogenen ein auf Protonen basierendes elektrochemisches Membranpotential nachweisen. Ferner konnte eine  $\text{H}^+$ -abhängige  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATPase isoliert werden (Ivey und Ljungdahl, 1986). In Membranen von *M. thermoacetica* und dem nahe verwandten Bakterium *M. thermoautotrophica* wurden Menachinon MK-7, *b*-Typ-Cytochrome, Ferredoxin und Rubredoxin identifiziert, die als Elektronenüberträger im Zuge der Energiekonservierung durch  $\text{H}^+$ -abhängige, chemiosmotische Prozesse fungieren könnten (Gottwald *et al.*, 1975; Yang *et al.*, 1980; Das *et al.*, 1989; Das und Ljungdahl, 2003). Welche Komponenten als Elektronendonatoren oder terminale Akzeptoren an einer energiekonservierenden Elektronentransportkette beteiligt sind, ist gegenwärtig allerdings unbekannt. Alle Enzyme des Wood-Ljungdahl-Weges sind bei einem Zellaufschluß mittels einer „French Press“ in der löslichen, cytoplasmatischen Fraktion zu finden. Membrangebundene Enzyme werden bei dieser Aufschluß-Methode möglicherweise von der Membran abgeschert. Durch Anwendung alternativer Zellaufschluß-Verfahren wurde gezeigt, dass einige dieser Enzyme zumindest lose mit der Membran assoziiert sind. An Membranvesikeln wurde Hydrogenase-, NADH-Dehydrogenase, CO-Dehydrogenase- und Methylen-THF-Reduktase-Aktivität nachgewiesen (Hugenholtz *et al.*, 1987; Hugenholtz und Ljungdahl, 1989). Ferner wurde gezeigt, dass die Oxidation von CO an

Membranen mit der Generierung eines transmembranen  $H^+$ -Gradienten einhergeht (Hugenholtz und Ljungdahl, 1990). Die beteiligten Komponenten und Mechanismen sind bisher allerdings unbekannt.

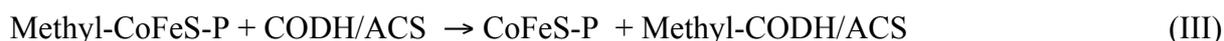
THAUER *et al.* (1977) schlugen vor, dass die Metylen-THF-Reduktase möglicherweise den terminalen Akzeptor einer Elektronentransportkette darstellt, die mit der Generierung eines transmembranen  $H^+$ -Gradienten einhergeht. Als Elektronen-Donatoren könnten dabei  $H_2$ , CO oder NADH fungieren, die durch membranständige Enzyme oxidiert werden (Abb. 3 A).

**Abb. 3. Hypothetisches Schema der Energiekonservierung durch chemiosmotische Mechanismen in A.  $H^+$ -abhängigen und B.  $Na^+$ -abhängigen acetogenen Bakterien.** Für Erläuterungen siehe 2.1 und 2.2. (nach Müller *et al.*, 2004)

## 2.2 Energiekonservierung in „Na<sup>+</sup>-abhängigen“ acetogenen Bakterien

Die CO<sub>2</sub>-Reduktion in acetogenen Bakterien und methanogenen Archaeen zeichnet sich biochemisch betrachtet durch zahlreiche Ähnlichkeiten aus. Methanogene nutzen für die Reduktion von CO<sub>2</sub> zu CH<sub>4</sub> eine Variante des Wood-Ljungdahl-Weges. Diese Reaktionssequenz ist strikt Na<sup>+</sup> abhängig (Perski *et al.*, 1981; 1982) und das für die Methanogenese essentielle, membranständige Enzym Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym M-Methyltransferase nutzt die im Zuge des Methylgruppen-Transfers von Methyltetrahydromethanopterin auf Coenzym M freiwerdende Energie für die Translokation von Na<sup>+</sup> über die cytoplasmatische Membran (Müller *et al.*, 1988; 1993; Lienard *et al.*, 1996; Gottschalk und Thauer, 2001).

In Analogie dazu konnte für die acetogenen Bakterien *A. woodii* (Heise *et al.*, 1989), *Thermoanaerobacter kivui* (früher: *Acetogenium kivui*; Yang und Drake, 1990) und *R. productus* (Geerligs *et al.*, 1989) eine strikte Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit der Acetogenese und des autotrophen Wachstums gezeigt werden. Bei *A. woodii* erfolgt im Zuge des Wood-Ljungdahl-Weges die Generierung eines primären transmembranen Na<sup>+</sup>-Potentials über der Cytoplasmamembran (Heise *et al.*, 1989). Versuche mit Suspensionen ruhender Zellen zeigten, dass die Reaktionssequenz



einhergeht mit der Translokation von Na<sup>+</sup>-Ionen. Thermodynamische Erwägungen sowie die cytoplasmatische Lokalisation der Methylen-THF-Reduktase, die Reaktion I katalysiert, lassen eine Beteiligung des Enzyms an der Generierung des transmembranen Na<sup>+</sup>-Potentials als unwahrscheinlich erscheinen (Wohlfarth und Diekert, 1991; Heise *et al.*, 1992). Der nachfolgende Methyl-Gruppentransfer (Reaktion II und III), der durch eine oder zwei Methyltransferasen katalysiert wird, wurde in „Na<sup>+</sup>-abhängigen“ acetogenen Bakterien bisher nicht detailliert untersucht. Bei „H<sup>+</sup>-abhängigen“ Acetogenen handelt es sich dabei um lösliche Enzyme (Ragsdale, 1991). In „Na<sup>+</sup>-abhängigen“ acetogenen Bakterien könnte sich die Situation allerdings anders darstellen. Die Entdeckung membrangebundener Corrinoiden (Dangel *et al.*, 1987) sowie die zahlreichen Analogien der CO<sub>2</sub>-Reduktionswege in Acetogenen und Methanogenen führte zu der Hypothese, dass der Methylgruppentransfer von

Methyl-THF auf die CODH/ACS mit der Translokation von  $\text{Na}^+$  einhergeht (Müller und Gottschalk, 1994). Die membranständige Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym M-Methyltransferase methanogener Archäen weist als Kofaktor ein Corrinoid auf, das essentiell für den Methylgruppentransfer ist. In Analogie dazu könnte das membrangebundene Corrinoid „ $\text{Na}^+$ -abhängiger“ acetogener Bakterien der Kofaktor einer  $\text{Na}^+$ -translozierenden Methyltransferase sein (Abb. 3B). Experimentelle Befunde liegen dazu allerdings noch nicht vor.

Zusammenfassend muß festgehalten werden, dass gegenwärtig die genauen Mechanismen der Energiekonservierung im Zuge des Wood-Ljungdahl-Weges weder für „ $\text{H}^+$ -abhängige“ noch „ $\text{Na}^+$ -abhängige“ acetogene Bakterien bekannt sind. Zur Klärung dieser Fragestellung könnte ein Vergleich mit analogen Systemen hilfreich sein. Hierfür bietet sich die Betrachtung der Nutzung alternativer Elektronenakzeptoren an.

### **3. Nutzung alternativer Elektronenakzeptoren und daran gekoppelte Mechanismen der Energiekonservierung**

Wie oben geschildert, fungiert  $\text{CO}_2$  bei acetogenen Bakterien während des heterotrophen Wachstums als terminaler Elektronenakzeptor. Die „Entsorgung“ der anfallenden Reduktionsäquivalente über den Wood-Ljungdahl-Weg ermöglicht die vollständige Oxidation von Hexosen zu Acetat einhergehend mit der Bildung von 4 Mol ATP/Mol Hexose durch Substratkettenphosphorylierung. Inzwischen liegen Untersuchungen vor, die zeigen, dass  $\text{CO}_2$  zumindest für einige Acetogene nicht der bevorzugten Elektronenakzeptor ist und unter bestimmten Bedingungen alternative terminale Elektronenakzeptoren preferentiell genutzt werden. Damit einhergehend wird weniger oder kein Acetat mehr gebildet.

#### **3.1 Alternative Elektronenakzeptoren bei acetogenen Bakterien**

*M. thermoacetica* und *M. thermoautotrophica* nutzen als bevorzugten terminalen Elektronenakzeptor Nitrat, welches zu Nitrit und Ammonium reduziert wird (Seifritz *et al.*, 1993; Fröstl *et al.*, 1996). In Nitrat-supplementierten Kulturen erfolgt bei Wachstum auf verschiedenen Substraten in Gegenwart von  $\text{CO}_2$  keine meßbare Bildung von Acetat. Beide

Organismen sind zudem in der Lage, Thiosulfat und Dimethylsulfoxid als alternative terminale Elektronenakzeptoren zu nutzen (Beatty und Ljungdahl, 1990, 1991). Fumarat kann von vielen Bakterien als terminaler Akzeptor für Elektronen des Stoffwechsels fungieren. Gut untersucht ist die die Fumaratatmung in *E. coli* oder *W. succinogenes* (Cecchini *et al.*, 2002; Kröger *et al.*, 2002). *C. formicoaceticum* und *C. aceticum* waren die ersten beschriebenen Beispiele acetogener Bakterien, die in der Lage sind Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor zu nutzen (Dorn *et al.*, 1978a; Matthies *et al.*, 1993).

*A. woodii* kann Phenylacrylate, die beim Abbau von Lignin entstehen, als terminale Elektronenakzeptoren verwenden. Erste Hinweise auf diese Fähigkeit lieferten Wachstumsversuche von BACHE *et al.* (1981), die zeigten, dass das Bakterium die Doppelbindung der Seitenkette von Verbindungen wie 3,4,5-Trimethoxycinnamat, Sinapat, Ferulat oder Caffeat reduzieren kann (Abb. 4). In nachfolgenden Untersuchungen zeigten TSCHECH und PFENNING (1984), dass *A. woodii* bei Wachstum auf Methanol oder Formiat in Gegenwart von CO<sub>2</sub> preferentiell Caffeat als terminalen Elektronenakzeptor nutzt. Caffeat wird dabei zu Hydrocaffeat reduziert (Abb. 4). Damit einhergehend war eine Verringerung der gebildeten Acetatmenge zu beobachten.

Für das acetogene Pansenbakterium *R. productus* wurde ebenfalls die Fähigkeit beschrieben, die Seitenkette von Phenylacrylaten als terminalen Elektronenakzeptor zu nutzen (Misoph *et al.*, 1996).

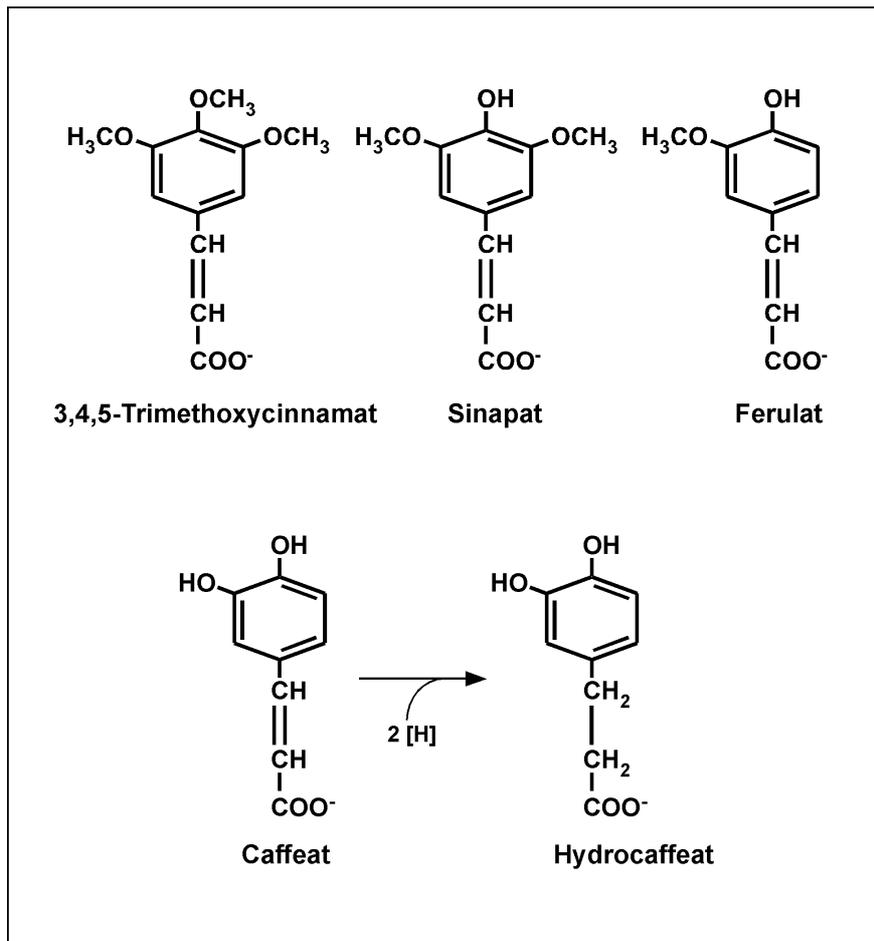


Abb. 4. Phenylacrylate als terminale Elektronenakzeptoren bei *A. woodii*. [H] entspricht  $1 e^-$ .

### 3.2 Energiekonservierung im Zuge der Nutzung alternativer terminaler Elektronenakzeptoren

Wie oben dargelegt, ist die Reduktion des terminalen Elektronenakzeptors  $\text{CO}_2$  im Wood-Ljungdahl-Weg unter chemolithoautotrophen Wachstumsbedingungen an  $\text{H}^+$ - oder  $\text{Na}^+$ -abhängige chemiosmotische Prozesse gekoppelt, die der Konservierung von Energie dienen. Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass die Nutzung alternativer Akzeptoren bei acetogenen Bakterien nicht nur der „Entsorgung“ von anfallenden Elektronen und der Regenerierung oxidierter Elektronenüberträger dient, sondern ebenfalls mit der Konservierung von Energie einhergeht. Detaillierte Kenntnisse über die zu Grunde liegenden Mechanismen liegen aber in den meisten Fällen nicht vor.

Wachstumsversuche mit *M. thermoacetica* und *M. thermoautotrophica* zeigten, dass die Reduktion von Nitrat zu Nitrit und Ammonium mit Energiekonservierung gekoppelt ist.

Nitrat-supplementierte Kulturen produzierten deutlich mehr Biomasse als Kulturen, die in Abwesenheit des alternativen Elektronenakzeptors Nitrat gewachsen waren (Seifritz *et al.*, 1993; Fröstl *et al.*, 1996; Seifritz *et al.*, 2003). Für die an Nitrat-Reduktion gekoppelte Energiekonservierung wird ein chemiosmotischer Mechanismus ähnlich der Nitrat-Atmung in *E. coli* diskutiert (Richardson *et al.*, 2001; Simon, 2002; Jormakka *et al.*, 2003).

MATTHIES *et al.* (1993) zeigten, dass *C. formicoaceticum* unter definierten Bedingungen Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor nutzen und energiekonservierend zu Succinat reduzieren kann (Matthies *et al.*, 1993). Bei Abwesenheit von CO<sub>2</sub> ist das Bakterium nicht in der Lage, in mineralischem Minimalmedium mit Methanol oder Vanillat zu wachsen. Die Gegenwart von Fumarat ermöglicht Wachstum unter diesen Bedingungen, wobei dabei die Konservierung von Energie offensichtlich durch die Reduktion des Fumarats bewerkstelligt wird. Neben einer an der Außenseite der Cytoplasmamembran lokalisierten Fumarat-Reduktase wurden in *C. formicoaceticum* b-Typ-Cytochrome sowie Menachinone identifiziert (Dorn *et al.*, 1978b). Die Energiekonservierung im Zuge der Fumarat-Reduktion erfolgt in diesem Bakterium daher möglicherweise mittels chemiosmotischer Prozesse, wie sie für die H<sub>2</sub>-abhängige Fumarat-Atmung bei *E. coli* oder *Wolinella succinogenes* beschrieben wurden (Cecchini *et al.*, 2002; Kröger *et al.*, 2002).

Aus dem Vergleich von Zellerträgen schlossen TSCHECH und PFENNIG (1984), dass die Reduktion aromatischer Acrylatverbindungen wie Caffeat in *A. woodii* mit der Konservierung von Energie einhergeht. Caffeat-supplementierte Kulturen von *A. woodii* erreichten bei Wachstum auf Methanol 2,5-fach höhere Zelldichten als Vergleichskulturen ohne Caffeat. Versuche mit Suspensionen ruhender Zellen belegten, dass die Reduktion von Caffeat mit H<sub>2</sub> als Elektronendonator mit der Bildung von ATP gekoppelt ist (Hansen *et al.*, 1988). Die Zugabe von Caffeat zu Zellsuspensionen von *A. woodii* unter einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre führte zu einem raschen Anstieg des zellulären ATP-Gehalts. Nach Zugabe von Nigericin und Valinomycin, Verbindungen die das elektrochemische Potential dissipieren, nahm der ATP-Gehalt wiederum drastisch ab. Da mit H<sub>2</sub> als Elektronendonator Substratkettenphosphorylierung ausgeschlossen ist, wurde für die mit Caffeatreduktion gekoppelte Energiekonservierung ein chemiosmotischer Mechanismus postuliert. Nachfolgende Untersuchungen zeigten schliesslich, dass die H<sub>2</sub>-abhängige Caffeatreduktion und die damit verbundenen ATP-Synthese in *A. woodii* über einen chemiosmotischen Mechanismus gekoppelt sind, der Na<sup>+</sup> als Kopplungssion nutzt (Imkamp und Müller, 2002). In Analogie zur autotrophen CO<sub>2</sub>-Reduktion im Wood-Ljungdahl-Weg war die H<sub>2</sub>-abhängige Caffeatreduktion strikt Na<sup>+</sup>-abhängig. Die Zugabe Na<sup>+</sup>-spezifischer Ionophore zu

caffeatreduzierenden Zellsuspensionen führte zu einer drastischen Stimulierung der Reduktionsaktivität. Protonophore hatten keinen Einfluß. Diese Beobachtungen deuteten klar auf die Anwesenheit eines Enzyms hin, dass im Zuge der H<sub>2</sub>-abhängigen Caffeatreduktion Na<sup>+</sup> aus dem Cytoplasma transloziert und so die Generierung eines transmembranen Na<sup>+</sup>-Potentials bewerkstelligt. In Folge dessen kommt es zu einer thermodynamischen „feedback“-Hemmung, die zu einer Verringerung der Na<sup>+</sup>-Translokation und damit einhergehend der enzymatischen Aktivität führt. Dieses als respiratorische Kontrolle bekannte Phänomen wurde erstmals für Mitochondrien beschrieben (Beechey *et al.*, 1967). Die Zugabe eines Na<sup>+</sup>-Ionophors führt zu einem Abbau des Na<sup>+</sup>-Potentials und einer Aufhebung der respiratorischen Kontrolle. Die Caffeatreduktion kann dadurch wiederum ungehindert, d.h. stimuliert ablaufen. Die mit H<sub>2</sub>-abhängiger Caffeatreduktion gekoppelte ATP-Synthese war ebenfalls strikt Na<sup>+</sup>-abhängig. In Gegenwart Na<sup>+</sup>-spezifischer Ionophore bildeten H<sub>2</sub>-inkubierte Zellsuspensionen nach Zugabe von Caffeate kein ATP. Protonophore hatten hingegen keinen Einfluß. Dies zeigte deutlich, dass die ATP-Synthese, die mit H<sub>2</sub>-abhängiger Caffeatreduktion gekoppelt ist, von dem im Zuge der Reaktion generierten Na<sup>+</sup>-Potential abhängig ist (Imkamp und Müller, 2002).

#### 4. Fragestellung der Arbeit

Die molekularen und mechanistischen Grundlagen der Energiekonservierung im Zuge der Acetogenese im Wood-Ljungdahl-Weg sind weitgehend unbekannt. Wie oben dargelegt, sind acetogene Bakterien in der Lage, die im Stoffwechsel freiwerdenden Elektronen nicht nur auf CO<sub>2</sub> sondern u. a. auch auf Nitrat, Fumarat oder Caffeate zu übertragen und dabei ebenfalls Energie zu konservieren. Möglicherweise spielen dabei in allen Fällen die gleichen oder ähnliche Mechanismen eine Rolle. Die Untersuchung der an die Nutzung von alternativen terminalen Elektronenakzeptoren gekoppelten Reaktionen könnte daher zu weiterführenden Erkenntnissen über Energiekonservierung in acetogenen Bakterien im Allgemeinen führen.

Am Beispiel des Modellorganismus *A. woodii* sollten im Rahmen dieser Arbeit Komponenten des Caffeatreduktionssystems identifiziert werden. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Charakterisierung der an H<sub>2</sub>-abhängiger Caffeatreduktion beteiligten enzymatischen Aktivitäten und der Bestimmung der zellulären Lokalisation involvierter Komponenten. Von besonderem Interesse war dabei die Identifikation des Na<sup>+</sup>-translozierenden Enzymes, das für

die Generierung des transmembranen elektrochemischen Potentials im Zuge der Caffeat-Atmung verantwortlich ist.

## Material und Methoden

### 1. Organismen, Plasmide, Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst.

**Tabelle 1. Verwendete Bakterienstämme**

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
<i>Acetobacterium woodii</i>	Wildtyp	DSM 1030, DSMZ
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F $\phi$ 80d/ <i>lacZ</i> M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hspR17</i> ( $r_k^- m_k^+$ ) <i>supE44<math>\lambda</math> thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Wildtyp	DSM 525, DSMZ

**Tabelle 2. Verwendete Plasmide**

Plasmid	relevante Merkmale	Referenz
pMal-C2	Amp <sup>r</sup> , <i>malE</i> , <i>lacI</i> , P <sub>tac</sub> , <i>lacZ</i> , M13 <i>ori</i>	NEB, USA
pCR 2.1-TOPO	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , <i>lacPZ<math>\alpha</math>'</i>	Invitrogen, Karlsruhe

Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3. Plasmidkonstrukte**

Plasmidname	Insert (Schnittstellen)	Insertions- größe (Bp)	Ursprungsplasmid
pTOPO- <i>etfA</i>	<i>etfA</i>	924	pCR 2.1-TOPO
pTOPO- <i>etfB</i>	<i>etfB</i>	207	pCR 2.1-TOPO
pMal- <i>etfA</i>	<i>etfA</i> ( <i>Bam</i> HI/ <i>Sall</i> )	900	pMal-C2
pMal- <i>etfB</i>	<i>etfB</i> ( <i>Eco</i> RI/ <i>Pst</i> I)	504	pMal-C2
pTOPO- <i>etfBA</i>	<i>etfBA</i>	1713	pCR 2.1-TOPO

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm) bezogen und sind in Tabelle 4 aufgeführt. Restriktions-Schnittstellen sind durch Fettdruck hervorgehoben und unterstrichen.

**Tabelle 4. Verwendte Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Zielgen; Spezifität
EtfA_forward	TGGGTNTTYGCNGARCARMGN <sup>1)</sup>	<i>etfA</i> ; degeneriert
EtfA_reverse	RTCNCCNACRATNCCRTARTC <sup>1)</sup>	<i>etfA</i> ; degeneriert
EtfA_forward <i>Bam</i> HI	GTATTTGCC <b><u>GGATCCC</u></b> CGTGAAG	<i>etfA</i> ; homolog
EtfA_reverse <i>Sall</i>	GTCGCCTAC <b><u>GTCGAC</u></b> GTAATC	<i>etfA</i> ; homolog
EtfB_forward	ATGGGNGCNGAYGARGCNTAY <sup>1)</sup>	<i>etfB</i> ; degeneriert
EtfB_reverse	NACRTANGTNACNACNGGCAT <sup>1)</sup>	<i>etfB</i> ; degeneriert
EtfB_forward <i>Eco</i> RI	<b><u>GGAATTC</u></b> ATGGGGGCGGACGAAG	<i>etfB</i> ; homolog
EtfB_reverse <i>Pst</i> I	AA <b><u>CTGCAG</u></b> CGGTGGTCC	<i>etfB</i> ; homolog
pMalc2 5'	CACGTATTGCCGCCACCATGG	Sequenzierungs- primer für pMal-C2
pMalc2 3'	CTATTACGCCAGCTGGCGAAA	Sequenzierungs- primer für pMal-C2

Tabelle 4 (Fortsetzung)

M13 Forward	GTAAAACGACGGCCAG	Sequenzierungs- primer für pCR 2.1-TOPO
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierungs- primer für pCR 2.1-TOPO
EtfB-Seq.	GTTCTCACCACCAGCTAAAG	Sequenzierungs- primer für TOPO- <i>etfBA</i>

<sup>1)</sup>N = A,C,G,T      M = A,C      R = A,G      Y = C,T

## 2. Nährmedien und Supplemente

### 2.1 Phosphat/Carbonat-gepuffertes Komplexmedium für Anzuchten von *Acetobacterium woodii* (Braun und Gottschalk, 1981; modifiziert)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,76 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
Cystein-HCl	0,5 g
NaCl	2,9 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,33 g
KHCO <sub>3</sub>	6,0 g
Hefeextrakt	2,0 g
Spurenelemente-Lösung SL9 (10x)	1,0 ml
Selenitlösung	1,0 ml
Vitaminlösung DSMZ 141 (10x)	2,0 ml
Resazurin	1,0 mg
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1000 ml
pH 7,2 – 7,3	

Spurenelemente-Lösung SL9 (10x; Tschsch und Pfennig, 1984)

CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O		0,2 g
CuCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O		2,0 mg
FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O		2,0 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		6,0 mg
MnCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O		0,1 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O		36,0 mg
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O		24,0 mg
Nitrilotriacetat		12,8 g
ZnCl <sub>2</sub>		70,0 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1000 ml

Der pH wurde mit 1 M KOH auf einen Wert von 3,3 – 3,5 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

Vitamin-Lösung DSMZ 141 (10x; Claus *et al.*, 1983)

Biotin		2,0 mg
DL-Ca-Panthothensäure		5,0 mg
Folsäure		2,0 mg
Liponsäure		5,0 mg
Nikotinsäure		5,0 mg
Pyridoxin-Hcl		10,0 mg
p-Aminobenzoesäure		5,0 mg
Riboflavin-HCl		5,0 mg
Thiamin-HCl		5,0 mg
Vitamin B <sub>12</sub>		0,1 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1000 ml

Die Vitaminlösung wurde lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Die Herstellung des Nährmediums erfolgte in einer modifizierten Form der von HUNGATE (1969) und BRYANT (1972) beschriebenen anaeroben Techniken. Hierfür wurde

das Medium mit einem N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Gasgemisch (80:20 [v/v]) 20 min durchgast. Der gewünschte pH-Wert stellte sich dabei ein oder wurde gegebenenfalls mit 1 M HCl eingestellt. Die Kulturgefäße wurden ebenfalls 20 min mit N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> durchgast, anschließend mit dem anaeroben Medium befüllt, verschlossen und autoklaviert.

## 2.2 Nährmedium für *Escherichia coli*

### LB (Luria-Bertani) Medium

Pepton	10,0 g
NaCl	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1000 ml

Zur Herstellung von Agarplatten wurde Japanagar in einer Endkonzentration von 1,5% [w/w] zugegeben. Zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Stämme wurde dem Medium nach dem Autoklavieren Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

## 2.3 Nährmedium für *Clostridium pasteurianum*

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Glukose	10,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1000 ml
pH 7,4	

## 3. Zellanzucht

### 3.1 Anaerobe Anzucht von *A. woodii*

Die Anzucht von *A. woodii* erfolgte in 50-ml-Kulturen in 100-ml-Serumflaschen (Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern), in 500-ml-Kulturen in 1,2-l-Infusionsflaschen (Glasgerätebau Ochs) oder in 17-l-Kulturen in 20-l-Steilbrustflaschen (Glasgerätebau Ochs). Als Wachstumssubstrate wurden 20 mM Fruktose, 60 mM Methanol oder 200 mM Formiat verwendet, die vor dem Beimpfen aus anaeroben Stammlösungen mittels steriler Einwegspritzen zugegeben wurden. 20-l-Steilbrustflaschen wurden offen autoklaviert und anschliessend mit Substrat,  $\text{KHCO}_3$  und dem Reduktionsmittel Cystein supplementiert. Anzuchten mit  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$  (80:20 [v/v]) erfolgten in 50-ml-Kulturen in 100-ml-Serumflaschen. Nach dem Beimpfen wurde  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (80:20 [v/v]) gegen  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  (80:20 [v/v]) ausgetauscht. Die Kulturgefäße wurden bei 30°C in einem Schüttelwasserbad (180 Upm; GFL 1083, GFL, Burgwedel) inkubiert. Um eine optimale Gasversorgung der Kulturen zu gewährleisten wurden die Serumflaschen kontinuierlich mit 0,8 bar  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$  (80:20 [v/v]) begast. Das Inokulum betrug 6%.

#### 3.1.1 Anzucht von *A. woodii* zur Herstellung von Zellsuspensionen

Für die Herstellung von Suspensionen ruhender Zellen wurden 500-ml-Kulturen in 1,2-l-Infusionsflaschen in Phosphat/Carbonat-gepuffertem Medium mit 20 mM Fruktose angezogen. Zur Induktion der Caffeat-, Ferulat-, oder *p*-Cumarsäurereduktion wurde den Kulturen bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,3 (bei Wachstum mit Fruktose) bzw. 0,1 (bei Wachstum mit Methanol oder Formiat) die entsprechende Verbindung in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben.

#### 3.1.2 Anzucht von *A. woodii* zur Herstellung zellfreier Rohextrakte

Zur Herstellung zellfreier Rohextrakte wurden 17-l-Kulturen in 20-l-Steilbrustflaschen in Phosphat/Carbonat-gepuffertem Medium angezogen. Als Substrat wurde den Kulturen Fruktose in einer Endkonzentration von 20 mM zugegeben. Bei Bedarf wurde zur Induktion der Caffeatreduktion bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,3 – 0,4 Caffeat in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben.

### **3.1.3 Bestimmung der Zelldichte**

Das Wachstum der Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers (Spektrophotometer U-1500, Hitachi, Japan) verfolgt. Dazu wurde ein Aliquot der Kultur in eine 1-ml Kunststoffküvette überführt. Um eine Verfälschung der Messung durch Rotfärbung des Resazurins, bedingt durch den Sauerstoffkontakt des Mediums, zu vermeiden, wurde die Probe durch Zugabe einer Spatelspitze Natriumdithionit reduziert. Bei optischen Dichten  $> 0,5$  wurden die Proben vor der Messung mit Medium verdünnt.

### **3.1.4 Reinheitskontrolle**

Alle Kulturen wurden vor ihrer weiteren Verwendung in einem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss, Jena) auf mögliche Kontaminationen hin überprüft.

### **3.1.5 Stammkulturen**

Die Stammhaltung von *A. woodii* erfolgte in 50-ml-Kulturen in 100-ml-Serumflaschen in dem oben beschriebenen Medium. Die Kulturen wurden in etwa zweiwöchigem Abstand in frisches Medium überimpft und nach Erreichen der spätexponentiellen Wachstumsphase bei 4°C gelagert.

## **3.2 Anzucht von *E. coli***

*E. coli* wurde in 5-ml-Kulturen in 15-ml-Reagenzgläsern in einem Rollinkubator und bei größeren Anzuchten in 1-l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen unter Schütteln (180 Upm) bei 37°C inkubiert.

### **3.2.1 Stammkulturen**

Stammkulturen wurden über kürzere Zeiträume auf LB-Agarplatten bei 4°C gelagert. Zur Konservierung der Stämme wurden 1-ml-Aliquots einer Flüssigkultur in sterile 1,5-ml-Schraubdeckel-Reaktionsgefäße überführt und mit sterilem Glycerin supplementiert (20% Endkonzentration). Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

### 3.3 Anaerobe Anzucht von *Clostridium pasteurianum*

Zur Isolierung von Ferredoxin aus *C. pasteurianum* wurden 10-l-Kulturen in 12-l-Steilbrustflaschen angezogen. Dazu wurden die mit Medium befüllten Kulturgefäße offen autoklaviert, anschliessend 20 min mit N<sub>2</sub> durchgast und verschlossen. Das Inokulum betrug 5%. Die Kulturen wurden bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Die Stammhaltung von *C. pasteurianum* erfolgte in 50-ml-Kulturen in 100-ml-Serumflaschen in dem oben beschriebenen Medium. Die Kulturen wurden in etwa zweiwöchigem Abstand in frisches Medium überimpft und nach Erreichen der spätexponentiellen Wachstumsphase bei 4°C gelagert.

### 3.4 Herstellung von Zellsuspensionen von *A. woodii*

Zur Herstellung von Zellsuspensionen wurden die Zellen in der spätexponentiellen Wachstumsphase bei einer OD<sub>600</sub> von 1,6 – 1,8 geerntet. Zu diesem Zeitpunkt waren 90 – 95% des zugegebenen Caffeats reduziert. Die Kulturen wurden in einer Anaerobenkammer (Coy, Grass Lake, MI, USA) in 500-ml-Zentrifugenbecher überführt und 15 min bei 5000 Upm in einer Kühlzentrifuge (Beckmann Avanti J-25, JA 10-Rotor; Beckmann Instruments, Palo Alto, CA, USA) bei 4°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit anaerobem Imidazol-Waschpuffer gewaschen, in 10 – 15 ml desselben Puffers resuspendiert und in ein Schraubdeckelröhrchen mit Butylgummiseptum (Glasgerätebau Ochs) überführt. Der Proteingehalt der konzentrierten Zellsuspensionen, die bis zur Verwendung in Eis unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre aufbewahrt wurden, betrug 10 – 16 mg/ml. Zur strikten Einhaltung anaerober Bedingungen wurden bei der Herstellung der Zellsuspensionen alle Arbeitsschritte in einer Anaerobenkammer unter einer N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>-Atmosphäre (95:5 [v/v]) durchgeführt.

Imidazol-Waschpuffer

Imidazol-HCl	3,4 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	4,9 g
DTE	0,78 g
Resazurin	1,0 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

Der pH wurde mit HCl<sub>konz.</sub> auf 7,0 eingestellt. Der Puffer wurde durch 20-minütiges, intensives Durchgasen mit N<sub>2</sub> von Sauerstoff befreit. Die Lagerung erfolgte in 1,2-l-Infusionsflaschen unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre.

**3.5 Versuche mit Zellsuspensionen**

Die Durchführung der Versuche mit Zellsuspensionen erfolgte in 58-ml-Steilbrustflaschen (Glasgerätebau Ochs). Diese wurden in der Anaerobenkammer mit 9 ml Imidazol-Puffer (siehe 3.4) befüllt. Mit Hilfe einer 1-ml-Einwegspritze erfolgte die Zugabe von 1 ml der konzentrierten Zellsuspension. NaCl wurde wie angegeben hinzugegeben. Die Gasatmosphäre wurde je nach Bedarf gegen H<sub>2</sub> oder N<sub>2</sub> ausgetauscht. Nach 10 min Vorinkubation bei 30°C in einem Schüttelwasserbad (180 Upm) wurde den Zellsuspensionen Caffeate, Ferulat oder *p*-Cumarsäure in einer Endkonzentration von 10 mM aus 100 mM Stammlösungen zugegeben. Die Probenentnahme (0,5 ml) erfolgte mit Hilfe einer 1-ml-Einwegspritze. Die Bestimmung der Caffeate-, Ferulat- oder *p*-Cumarsäurekonzentration der Proben erfolgte wie unter 5. beschrieben.

**4. Herstellung zellfreier Rohextrakte (Heise, 1992; modifiziert)**

Für die Untersuchungen der H<sub>2</sub>- oder NADH-abhängigen Caffeatreduktion sowie der an Caffeatreduktion beteiligten enzymatischen Aktivitäten wurden zellfreie Rohextrakte von *A. woodii* hergestellt. Dazu wurden 17-l-Kulturen wie unter 3.1.2 beschrieben angezogen. Die Zellernte erfolgte in der spätexponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> 1,6 - 1,8) in einer Durchlaufzentrifuge (14.000 Upm; Contifuge Strato, Heraeus, Osterode). Zu diesem

Zeitpunkt waren 90 – 95% des zugegebenen Caffeats reduziert. Um möglichst anaerobe Bedingungen zu gewährleisten, wurde der Rotor vor der Ernte 10 min mit N<sub>2</sub> durchgast. Die sedimentierten Zellen wurden zweimal mit Imidazol-Puffer (siehe 3.4) gewaschen. Zur Herstellung von Protoplasten wurde das Zellsediment anschliessend in 100 ml Lysozym-Puffer resuspendiert, mit Lysozym versetzt (5 mg/ml) und in einem 500-ml-Zentrifugenbecher 1,5 h unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (20 min, 6000 Upm, 4°C) wurde das Sediment in 30 – 50 ml Lagerpuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 0,1 mM PMSF (Stammlösung: 100 mM in Isopropanol) und einer Spatelspitze DNase I wurden die Protoplasten in der „French Pressure Cell Press“ (SLM Aminco; SLM Instruments, Rochester, NY, USA) bei 650 psiG aufgeschlossen. Durch zweimalige Zentrifugation (45 min, 15.000 Upm; JA 25.50-Rotor ) wurden Protoplasten und restliche Zelltrümmer entfernt. Der so erhaltene zellfreie Rohextrakt enthielt Cytoplasma und invertierte Membranvesikel. Er wurde unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre auf Eis gelagert und innerhalb von 2 bis 3 Tagen verbraucht. Die Proteinkonzentration betrug 20 – 35 mg/ml.

#### Lysozym-Puffer und Lager-Puffer

Imidazol-HCl	3,40 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	4,93 g
DTE	0,771 g
Saccharose	143,76 g
Resazurin	1,0 mg
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1000 ml

Der pH des Lysozym-Puffers wurde auf 8 eingestellt, der des Lager-Puffers, der in seiner Zusammensetzung identisch mit dem Lysozym-Puffers ist, auf pH 7,0. Die Puffer wurden durch 20-minütiges, intensives Durchgasen mit N<sub>2</sub> von Sauerstoff befreit. Die Lagerung erfolgte in 1,2-l-Infusionsflaschen unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre.

### **4.1 Präparation der cytoplasmatischen Fraktion und gewaschener Membranen**

Um den zellfreien Rohextrakt in die Cytoplasma- und Membranfraktion zu trennen, wurde dieser bei  $190.000 \times g$  16 h bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (Beckmann L-70 Ultrazentrifuge, Ti50.2-Rotor; Beckmann Instruments). Der daraus erhaltene Überstand wird im weiteren als Cytoplasma bezeichnet. Das Sediment wurde durch intensives Homogenisieren in Lager-Puffer resuspendiert, zweimal gewaschen (1,5 h,  $190.000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , Beckmann L-70 Ultrazentrifuge, Ti50.2-Rotor) und anschliessend in 1,5 – 3,5 ml Lager-Puffer (siehe 4.) aufgenommen. Diese Fraktion wird im Folgenden als gewaschene Membranen bezeichnet. Die Proteinkonzentration betrug 20 – 40 mg/ml.

Das Cytoplasma wurde durch zwei hochoberflächige Zentrifugationsschritte von restlichen Membranen befreit (1,5 h, 40.000 Upm,  $4^{\circ}\text{C}$ , Beckmann L-70 Ultrazentrifuge, Ti50.2-Rotor). Die Proteinkonzentration der Cytoplasmafraktion betrug 20 – 40 mg/ml. Die Lagerung der Fraktionen erfolgte bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf Eis unter einer  $\text{N}_2$ -Atmosphäre.

## **4.2 Versuche mit zellfreien Extrakten, Cytoplasma- und Membranfraktion**

### **4.2.1 Versuche zur Caffeatreduktion**

Die Versuche zur Caffeatreduktion wurden in 2,5-ml-Schraubdeckelgefässen mit Butylgummisepten (Glasgerätebau Ochs, Bovenden) durchgeführt. Durch mehrmaliges Be- und Entgasen wurde die Luft in den Gefässe  $\text{N}_2$  ausgetauscht. Die Zugabe des zellfreien Rohextraktes, der Cytoplasma- oder Membranfraktion erfolgte mittels 1-ml-Einwegsspritzen. Es folgte eine 10-minütige Inkubation in einem Schüttelwasserbad ( $30^{\circ}\text{C}$ , 180 Upm), wobei bei den Versuchen zur  $\text{H}_2$ -abhängigen Caffeatreduktion die Gasatmosphäre gegen  $\text{H}_2$  ausgetauscht wurde. Anschliessend wurden die Ansätze wie angegeben supplementiert. Mit Hilfe einer Hamilton- oder Unimatrix-Spritze (Fa. Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz; Unimetrics Corporation, Shorewood, IL, USA) wurden Proben (25  $\mu\text{l}$ ) entnommen, deren Caffeat-Konzentration wie unter 5. beschrieben bestimmt wurde.

### **4.2.2 Durchführung photometrischer Enzym-Tests**

Anaerobe Enzymtests wurden in mit Gummistopfen verschlossenen 1,5-ml-Quarzküvetten einer Schichtdicke von 0,5 oder 1 cm unter der jeweils angegebenen Gasatmosphäre durchgeführt. Um die Küvetten von Sauerstoff zu befreien wurden diese für etwa 15 min mehrfach be- und entgast und anschliessend mit dem entsprechenden Gas gefüllt. Die anaeroben Versuchspuffer wurden mit 1-ml-Plastikspritzen zugegeben. Proben und Supplemente wurden mit Hilfe einer Hamilton- oder Unimatrix-Spritze zugefügt. Aerobe Enzymtests wurden in unverschlossenen Quarzküvetten durchgeführt. Die Messungen erfolgten in einem UVIKON Spektralphotometer (BIO-TEK Instruments, Neufahrn) bei 30°C gegen Luft und wurden mit Hilfe des angeschlossenen Computers und der „Lab Power 3000“-Software aufgezeichnet. Die spezifischen Enzymaktivitäten wurden aus dem linearen Bereich der Kinetik mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes und der eingesetzten Proteinkonzentration berechnet. Folgende Extinktionskoeffizienten wurden dazu verwendet:

NAD <sup>+</sup>	$\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,5 / \text{mM} \times \text{cm}$
Benzylviologen	$\epsilon_{600 \text{ nm}} = 7,4 / \text{mM} \times \text{cm}$ $\epsilon_{578 \text{ nm}} = 8,65 / \text{mM} \times \text{cm}$
Kaliumhexacyanoferrat	$\epsilon_{420 \text{ nm}} = 1,0 / \text{mM} \times \text{cm}$
Metronidazol	$\epsilon_{320 \text{ nm}} = 9,3 / \text{mM} \times \text{cm}$

Wurden Benzylviologen oder Kaliumhexacyanoferrat als Elektronenakzeptoren verwendet, war zu berücksichtigen, dass es sich hierbei um 1-Elektronenüberträger handelt.

#### 4.2.2.1 Hydrogenase

Die Bestimmung der Hydrogenaseaktivität von Rohextrakt, Cytoplasma- und Membranfraktion erfolgte anaerob unter einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre mit NAD<sup>+</sup> oder Benzylviologen als Elektronenakzeptoren. Als Test-Puffer diente 1 ml anaerober Imidazol-Puffer (50 mM Imidazol, 20 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 5 mM DTE, 1 mg/l Resazurin; pH 7,0), der mit Aliquots von Rohextrakt, Cytoplasma- oder Membranfraktion supplementiert wurde. Die Grundlinie wurde aufgenommen und die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5 mM NAD<sup>+</sup> oder 1 mM Benzylviologen gestartet. Die Reduktion der Elektronenakzeptoren wurde bei

340 nm bzw. 600 nm aufgezeichnet. Kontrollansätze, die unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert wurden, wiesen keine Aktivität auf.

#### 4.2.2.2 NADH-oxidierende Aktivität

An anaerob oder aerob hergestellten Membranen von *A. woodii* war eine NADH-oxidierende Aktivität meßbar. Messungen unter anaeroben Bedingungen erfolgten unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre. Als Test-Puffer diente 1 ml anaerober MOPS-Puffer (50 mM MOPS, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM NaCl; pH 7,0). Dieser enthielt kein DTE als Reduktionsmittel, da der verwendete Elektronenakzeptor Kaliumhexacyanoferrat durch DTE chemisch reduziert wird. Aliquots einer Membranpräparation wurden zugegeben und die Grundlinie wurde bei 420 nm aufgenommen. Die Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat in einer Endkonzentration von 1 mM resultierte in einem Anstieg der Absorption um 0,5 Einheiten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Die ermittelten Aktivitäten wurden gegen die Basalaktivität des Kontrollansatzes, dem keine Membranen zugegeben worden waren, korrigiert. Die Messung der NADH-oxidierenden Aktivität mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor erfolgte in gleicher Weise bei einer Wellenlänge von 578 nm. Kontrollansätze ohne Membranen wiesen keine Aktivität auf. Messungen unter aeroben Bedingungen erfolgten in aeroben MOPS-Puffer (siehe oben) mit Kaliumhexacyanoferrat als Elektronenakzeptor.

Die Bestimmung der zellulären Verteilung der NADH-oxidierenden Aktivität erfolgte anaerob unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre. Als Test-Puffer wurde hierbei 1 ml anaerober Imidazol-Puffer (50 mM Imidiazol, 20 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 5 mM DTE, 1 mg Resazurin/l; pH 7,0) verwendet, der mit Aliquots von Rohextrakt, Cytoplasma- oder Membranfraktion supplementiert wurde. Als Elektronenakzeptor wurde 1 mM Benzylviologen eingesetzt. Die Grundlinie wurde bei 600 nm aufgenommen und die Reaktion durch die Zugabe von NADH zu einer Endkonzentration von 5 mM gestartet.

Untersuchungen zur Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit der membranständigen, NADH-oxidierenden Aktivität erfolgten in anaeroben 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,0, für dessen Herstellung Na<sup>+</sup>-armes Tris und destilliertes Wasser verwendet wurde. Die Na<sup>+</sup>-Konzentration des Puffer betrug 200 µM. Aliquots einer Membranpräparation wurden in 1 ml Test-Puffers gegeben. Nach Aufnahme der Grundlinie bei 420 nm wurde Kaliumhexacyanoferrat in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM

Kalium-NADH gestartet. Die Messungen erfolgten in Abwesenheit von NaCl oder in Gegenwart von 20 mM NaCl, das aus einer anaeroben, 5 M Stammlösung zugegeben wurde.

#### 4.2.2.3 Ferredoxin-NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase

Die Messung der Ferredoxin-NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase-Aktivität an gewaschenen Membranen von *A. woodii* erfolgte anaerob unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre gemäß der von JAYAMANI (2005) etablierten Methode zur Bestimmung dieser Aktivität in *C. tetanomorphum*. Dazu wurde 1 ml anaerober Versuchspuffer (50 mM MOPS, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM NaCl; der pH-Wert betrug je nach Versuchsbedingungen 7,5 oder 7,0) mit Aliquots einer Membranpräparation supplementiert. Die Grundlinie wurde bei 340 nm aufgenommen. Dann erfolgte die Zugabe von 30 – 50 µl Ferredoxin, das aus *C. tetanomorphum* oder *C. pasteurianum* isoliert worden war (siehe 7.6). Das Ferredoxin wurde durch Ti-(III)-Citrat (3,5 mM) reduziert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2,5 mM NAD<sup>+</sup> gestartet. Als Kontrolle dienten Versuchsansätze, denen kein Ferredoxin oder kein Ferredoxin und keine Membranen zugegeben wurden. Die ermittelte Aktivität wurde gegen die Basalaktivität der Kontrollansätze korrigiert.

### 5. Bestimmung der Konzentration von Phenylacrylaten

Die bei den Versuchen mit Suspensionen ruhender Zellen entnommenen Proben wurden für 10 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert. Nach Verdünnung des Überstandes (1:100) mit Imidazol-Puffer (siehe 3.4) wurde die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 312 nm (Caffeat und Ferulat) oder 286 nm (*p*-Cumarsäure) in einem Spektralphotometer (Spektrophotometer U-1500, Hitachi) ermittelt. Bei Experimenten zur Caffeatreduktion in zellfreien Fraktionen wurden die entnommenen Proben direkt mit Puffer verdünnt. Für die Berechnung der Phenylacrylat-Konzentration mit Hilfe der Lambert-Beer'schen Gleichung wurden die folgenden Absorptionskoeffizienten herangezogen: 13,72 (Caffeat), 10,4 (Ferulat) und 20,2 (*p*-Cumarsäure) mM<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>.

## 6. Molekularbiologische Methoden

### 6.1 Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden SAMBROOK *et al.* (1989) durchgeführt. Enzyme wurden von MBI-Fermentas (St. Leon Rot) oder Roche (Mannheim) bezogen und gemäß der Herstellerangaben verwendet. Die Plasmidisolierung aus *E. coli* wurde nach der von HOLMES und QUIGLEY (1981) beschriebenen Methode durchgeführt. Waren sehr reine Plasmidpräparationen erforderlich wurde ein Plasmidisolierungskit von Qiagen verwendet (QIAprep Spin Miniprep Kit; Qiagen Hilden). DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mit Hilfe des „QiaexII Gel Extraction“-Verfahrens gereinigt (Qiagen). Die Herstellung Transformations-kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode (Cohen *et al.*, 1972; Inoue *et al.*, 1990). Die Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen wurde in nach HANAHAN (1983) modifizierter Weise durchgeführt. Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch die Firma „Scientific Research and Development GmbH“ (Oberursel).

### 6.2 Isolierung chromosomaler DNA aus *A. woodii*

Die Isolierung chromosomaler DNA erfolgte durch eine nach RAHLFS (1998) modifizierte Methode. Zwei 500-ml-Kulturen von *A. woodii* wurden in der spätexponentiellen Wachstumsphase bei einer OD<sub>600</sub> = 1,6 – 1,8 geerntet (5000 Upm, 15 min, 4°C). Das Sediment wurde mit STE-Puffer gewaschen und anschließend in 15 ml desselben Puffers aufgenommen und mit 0,5 g Lysozym versetzt. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei 37°C in einem Schüttelwasserbad (180 Upm, GFL 1083) wurden die Zellen sedimentiert (3.000 Upm, 10 min, 4°C) und in 15 ml EDTA/Tris/Saccharose-Puffer, 1 ml SDS-Lösung (25% [w/v]) und 100 µl Proteinase K-Lösung (80 µg/ml TE-Puffer) aufgenommen. Der Ansatz wurde in ein steriles JA 25.50-Zentrifugenröhrchen überführt und 1 h bei 65°C in einem Wasserbad inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 Vol. Phenol und ein weiterer Zentrifugationsschritt (11.000 Upm, 30 min, 4°C). Der Überstand (wässrige Phase) wurde abgenommen, mit 1 Vol. Phenol versetzt und für 15 min bei 11.000 Upm abzentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase erneut abgenommen, mit 1 Vol. eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) versehen und einem weiteren Zentrifugationsschritt (11.000 Upm, 15 min, 4°C) unterzogen. Nach Zugabe von 1 Vol. eines

Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) erfolgte eine weitere Sedimentation (11.000 Upm, 15 min, 4°C). Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis der Überstand klar war. Zur vollständigen Fällung der DNA wurden der Überstand mit 3 Vol. eiskaltem Ethanol (96%) und 0,1 Vol. sterilem 3 M Natriumacetat (pH 5,5) versetzt und 30 min bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation sedimentiert (14.000 Upm, 30 min, 4°C). Das Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die gereingte DNA in 500 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> aufgenommen und über Nacht bei 37°C in einem Wasserbad resuspendiert.

STE-Puffer

Saccharose	6,7	g
Tris	0,61	g
EDTA	37,2	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	100 ml

EDTA/Tris/Saccharose-Puffer

EDTA	4,38	g
Tris	0,61	g
Saccharose	5,0	g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	100 ml

TE-Puffer (10x)

1 M Tris/HCl, pH 8,0	100	ml
0,5 M EDTA, pH 8,0	10	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	1000 ml

### 6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.*, 1986)

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion in 20 µl- oder 100 µl-Ansätzen in einem TPersonal minicycler (Biometra, Göttingen) oder in einem Eppendorf Mastercycler *gradient* (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Ein Standard-Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

DNA („Matrize“)	ca. 1 µg	<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl bzw. 2,5 µl
Oligonukleotid 1	2,5 pmol/µl Ansatz	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 20 µl bzw. ad 100 µl
Oligonukleotid 2	2,5 pmol/µl Ansatz		
dNTP-Gemisch (10 mM)	1 nmol/µl Ansatz		
Reaktions-Puffer (10x)	2 µl bzw. 10 µl		

Bei der verwendeten *Taq*-Polymerase handelte es sich um ein im Labor selbst aufgereinigtes Enzym. Das PCR-Programm umfasste eine 5-minütige Denaturierung der DNA bei 95°C, gefolgt von 30 Zyklen Denaturierung (95°C, 30 sec), Anlagerung (1 min) und Synthese (72°C). Das Programm wurde von einer 10-minütigen Inkubation bei 72° abgeschlossen. Bei Verwendung homologer Oligonukleotide wurde die vom Hersteller angegebene Anlagerungstemperatur verwendet. Sollten DNA-Fragmente mit Hilfe von degenerierten Oligonukleotiden amplifiziert werden, wurden in der Regel Temperaturgradienten zwischen 35°C – 55°C für die Anlagerung eingestellt. Für die Länge der Synthese wurde ein Richtwert von 1 min/1000 Bp herangezogen. Das Ergebnis der PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

#### Reaktions-Puffer (10 x)

Tris/HCl	100	mM
KCl	500	mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50	mM
MgCl x 6 H <sub>2</sub> O	15	mM
pH 8,6		

### **6.4 Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle von Nukleinsäure-Lösungen**

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäure-Lösungen wurde durch Ermittlung der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml. Der Quotient der Absorptionen 260 nm/280 nm kann für die Beurteilung der Reinheit herangezogen, wobei das Verhältnis zwischen 1,5 und 1,9 liegen sollte (Sambrook *et al.*, 1989). Ferner wurde ein „NanoDrop“-Spektralphotometer ND-1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet, mit dem von 1-µl-Aliquots einer Lösung die DNA-Konzentration und Reinheit bestimmt werden können.

### **6.5 Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarosegelelektrophorese**

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,8%igen Agarosegelen (0,8% Agarose [w/v] in TAE-Puffer, 30 – 40 ml Volumen, Laufstrecke 6,5 cm),

wobei horizontale Gelkammern eigener Bauart verwendet wurden. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte bei 75 Volt. Für die Auftrennung von DNA, die anschliessend auf Nylonmembranen übertragen werden sollte (5.6.2), wurden Gele mit einem Volumen von 200 ml und einer Laufstrecke von 11 cm verwendet. Die Elektrophorese wurde dabei für 12 h bei einer Spannung von 30 – 35 Volt durchgeführt. Als Grössenstandard diente in allen Fällen DNA des Phagen  $\lambda$ , die mit *Hind*III vollständig geschnitten worden war. Zum Beschweren der Proben und Markieren der Lauffront wurde der aufzutrennenden DNA jeweils 0,2 Vol. Stop-Mix zugegeben. Zum Anfärben der Nukleinsäuren wurden die Gele für 10 – 15 min in eine Ethidiumbromidlösung (1  $\mu$ g/ml H<sub>2</sub>O) eingelegt. Die gefärbte DNA konnte anschliessend mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) bei 302 nm sichtbar gemacht und durch einen Videoprinter (Sony, Tokyo, Japan) auf Thermopapier abgebildet werden.

<u>TAE-Puffer (20x)</u>		<u>STOP-Mix</u>	
Tris/HCl	96,88 g	Saccharose	0,15 M
EDTA	7,44 g	Harnstoff	0,5 M
Essigsäure <sub>konz.</sub>	22,8 g	EDTA	0,1 mM
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	1000 ml	Bromphenolblau	0,14 mM
pH 8,0		pH 7,0	

## 6.6 DNA-DNA-Hybridisierung

### 6.6.1 DNA-Sondenmarkierung mit Digoxigenin-11-dUTP (DIG)

DNA-Sonden wurden nach der „random primed“-Methode mit dem „DIG-DNA Labelling Kit“ (Boehringer, Mannheim) hergestellt. Dabei wird ein Gemisch von Hexanukleotiden aller Basensequenzen mit der zu markierenden, hitzedenaturierten DNA hybridisiert. Der komplementäre 3'-Strang wird anschliessend durch das Klenow-Fragment synthetisiert, wobei das Nukleotid-Analogon Digoxigenin-11-dUTP (DIG) in den neusynthetisierten Strang eingebaut wird. Für die Markierungsreaktion wurde 1  $\mu$ g amplifizierter DNA, die als Sonde dienen sollte, 10 min bei 100°C denaturiert und anschliessend sofort auf Eis abgekühlt. Die übrigen für die DNA-Markierung notwendigen Komponenten wurden dann dazupipettiert. Der Reaktionsansatz wurde für 12 h bei 37°C inkubiert.

DNA-Markierungsansatz

DNA, denaturiert	1	µg
10x Hexanukleotidmix	1	µl
10x dNTP-Mix	1	µl
Klenow-Fragment (1 U/µl)	1	µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad	12 µl

Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 µl EDTA (200 mM, pH 8) abgestoppt. Die Sonde wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

### 6.6.2 Übertragung von Nukleinsäuren auf Nylon-Membranen durch Vakuumblot (Peferoen *et al.*, 1982)

Zur Übertragung von DNA auf Membranen durch Unterdruck wurde ein modifiziertes Verfahren des Southern-Blots angewendet (Southern, 1975). Anstelle von Kapillarkräften wird die DNA durch den Unterdruck der Vakuumblot-Apparatur (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) aus Agarosegelen auf Nylon-Membranen überführt. Auf die befeuchtete Saugunterlage der Apparatur wurde eine Lage Whatman-Papier (3MM-Whatman, Whatman, Maldstone, UK) gelegt. Darauf wurde eine mit 20x SSC äquilibrierte Nylonmembran (GeneScreen Plus; Perkin Elmer, Zaventem, Belgien) gelegt und mit einer Plastikmaske abgedeckt, die ca. 5 mm mit dem Membranrändern überlappte. Das Agarosegel wurde dann luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Nach Befestigung des Deckels wurde in der Apparatur ein Unterdruck erzeugt. Das Agarosegels wurde zunächst mit 0,25 N HCl überschichtet und 10 min bei 60 mbar Unterdruck inkubiert. Dieser Schritt dient der Depurinierung und Fragmentierung der DNA und erhöht deren Transfereffizienz. Für die Hybridisierung muss die DNA in einzelsträngiger Form vorliegen. Hierzu erfolgte anschliessend ein Denaturierungsschritt (15 min, 60 mbar), bei dem das Agarosegel mit einer Lösung überschichtet wurde die 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH enthielt. Das Gel wird dann mit Tris-Puffer (1,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5) neutralisiert (15 min, 60 mbar). Anschliessend erfolgte der Transfer der DNA auf die Nylonmembran (30 min, 80 mbar). Das Agarosegel wird dabei mit 20x SSC überschichtet. Die Nylonmembran wurde dann zwischen zwei Lagen Whatman-Papier kurz getrocknet. Durch 3-minütige Bestrahlung mit UV-Licht (302 nm) wurde die DNA dann auf der Membran fixiert.

20x SSCNa-Citrat x H<sub>2</sub>O 0,3 M

NaCl 0,3 M

pH 7,0

**6.6.3 Hybridisierung von Nukleinsäuren mit DIG-markierten DNA-Sonden**

Die Hybridisierung von Sonden mit auf Nylonmembranen fixierter DNA erfolgte in verschraubbaren Glasröhrchen (Biometra, Göttingen) in einem Hybridisierungssofen (OV 2; Biometra, Göttingen). Die Membran wurde zunächst für 2 h mit 5 – 10 ml „DIG Easy Hyb“ bei 55°C vorinkubiert. Anschliessend erfolgte der Hybridisierungsschritt. Die Nylonmembran wurde hierzu 12 h bei 50°C mit 5 ml der „DIG Easy Hyb“-Lösung inkubiert, der die DIG-markierte Sonde (siehe 6.6.1) zugegeben worden war. Bei einer erstmaligen Verwendung der Sonde wurde diese vor Zugabe zu der „DIG Easy Hyb“-Lösung“ für 10 min bei 100°C denaturiert. Nach dem Hybridisierungsvorgang wurde die Sonde bei –20°C gelagert und konnte bis zu dreimal wieder verwendet werden. Die Nylonmembran wurde abschliessend zweimal für je 5 min bei Raumtemperatur mit 10 – 15 ml „Hyb I“ sowie zweimal 15 min bei 68°C mit 10 – 15 ml „Hyb II“ gewaschen.

„DIG Easy Hyb“ (Roche, Mannheim)

Die Herstellung erfolgte gemäß der  
Anleitung des Herstellers

Hyb I

20x SSC (siehe 6.6.2.) 100 ml  
SDS (10% [w/v]) 10 ml  
H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> ad 1000 ml

Hyb II

20x SSC 5 ml  
SDS (10% [w/v]) 10 ml  
H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> ad 1000 ml

#### 6.6.4 Die Detektion DIG-markierter DNA-Fragmente

Die Detektion markierter DNA-Fragmente erfolgte durch den immunologischen Nachweis des an die Sonde gebundenen DIG mit Hilfe eines spezifischen Antikörper-Konjugats (Roche, Mannheim).

Die gewaschenen Membranen wurden zunächst für 5 min unter leichtem Schütteln in Detektionspuffer 1 inkubiert. Zur Besetzung unspezifischer Bindungsstellen folgte eine 30-minütige Inkubation in Detektionspuffer 2, dem 1% „blocking“-Reagenz (Roche, Mannheim) zugegeben wurde. Anschliessend erfolgte die Zugabe des DIG-spezifischen Antikörper-Konjugats (1 µl/10 ml Puffer) in frischem Detektionspuffer 2 (+ 1% „blocking“-Reagenz). Nach 30 min wurde ungebundenes Konjugat durch Waschen (2x 15 min) mit Detektionspuffer 1 von der Membran entfernt. Die Membranen wurde nach 5-minütiger Inkubation in Detektionspuffer 3 in Plastikfolie zusammen mit fünf bis sechs Tropfen des Lumineszenz-Substrates eingeschweisst und 5 Minuten inkubiert. Nach vollständiger Entfernung des Substrates wurden die Membranen für 1 h einem Röntgenfilm (WICORex B+ Medical X-Ray Screen Film Blue Sensitive; Typon Imaging AG, Darmstadt) exponiert.

##### Detektionspuffer 1

TWEEN 20	3 ml
Detektionspuffer 2	ad 1000 ml

##### Detektionspuffer 2 (5x)

Maleinsäure	58 g
NaCl	43,5 g
NaOH	35 g
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1000 ml
pH 7,5	

##### Detektionspuffer 3

Tris	12,1 g
NaCl	5,48 g
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 1000 ml
pH 9,5	

##### „blocking“-Reagenz (10%[w/v])

„blocking“-Reagenz	10 g
Detektionspuffer 2 (5x)	20 ml
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 100 ml

## 7. Biochemische und Proteinanalytische Methoden

### 7.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von zellfreien Rohextrakten, Cytoplasma- und Membranfraktionen erfolgte durch eine nach LOWRY (1951) modifizierte Methode. Die Fraktionen wurden in der Regel vor Bestimmung der Proteinkonzentration mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  1:5 verdünnt. Aliquots von 5 – 20  $\mu\text{l}$  der verdünnten Proben wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  auf 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, mit 1 ml der „aktivierten“ Lösung A versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Anschliessend wurden 500  $\mu\text{l}$  der Lösung B zugegeben. Nach weiteren 30 min Inkubation bei RT erfolgte die Bestimmung der Extinktion der Proben bei 750 nm. Die Eichgerade wurde mit Rinderserumalbumin im Bereich von 0 - 50  $\mu\text{g}$  Protein/100  $\mu\text{l}$  Ansatz aufgenommen.

<u>Lösung A</u>		<u>Lösung A, „aktiviert“</u>	
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	10 g	Lösung A	1 Vol.
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g	SDS (5% [w/v])	2 Vol.
Na-Tartrat	1 g	NaOH (0,8 M)	1 Vol.
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 1000 ml		

$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  und Na-Tartrat wurden in 500 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  gelöst. Anschliessend wurde  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (in 500 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  gelöst) unter langsamen Rühren beigegeben. Lösung A wurde lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

<u>Lösung B</u>	
Folin-Reagenz	1 Vol.
$\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$	5 Vol.

Die „aktivierte“ Lösung A und Lösung B wurden frisch vor ihrer Verwendung hergestellt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellsuspensionen erfolgte nach der von SCHMIDT *et al.* (1963) beschriebenen Methode. Aliquots von 20 – 100  $\mu\text{l}$  einer Zellsuspension wurden in 2-ml-Eppendorf Reaktionsgefässe überführt, mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  auf 1 ml aufgefüllt und mit 125  $\mu\text{l}$  der Lösung A versetzt. Die Ansätze wurden 10 min bei 100°C gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Lösung B folgte ein 30-minütiger Inkubationsschritt bei 37°C. Die Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation (10 min, 14.000 Upm; Micro 24-48, Hettich, Tuttlingen) entfernt. Die

Bestimmung der Extinktion der Proben erfolgte bei einer Wellenlänge von 546 nm (Spectrophotometer 100-20, Hitachi) gegen einen Reagenzienleerwert. Die Eichkurve wurde mit Rinderserumalbumin im Bereich von 0 - 1 mg Protein/ml Ansatz aufgenommen.

<u>Lösung A</u>		<u>Lösung B</u>	
NaOH	16 g	K-Na-Tartrat	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ad	100 ml	NaOH	4 g
		CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	1 g
		KI	2,5 g
		H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> ad	400 ml

## 7.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte nach der von SCHÄGGER und VON JAGOW (1987) beschriebenen Methode. Die Proteine wurden nach der Auftrennung mit Coomassie Brilliant Blue G250 (Weber und Osborne, 1969) angefärbt.

## 7.3 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Identifizierung Caffeat-induzierter Proteine wurden Zellextrakte von *A. woodii* mittels 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Die durchgeführten Arbeitsschritte erfolgten in modifizierter Weise nach der von O'FARELL (1975) beschriebenen Methode. Zellen von *A. woodii*, die in 50 ml Phosphat/Carbonat-gepuffertem Medium in Gegenwart oder Abwesenheit von 10 mM Caffeat gewachsen waren, wurden in der spätexponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 1,6 - 1,8$ ) durch Zentrifugation geerntet. Das Sediment wurde einmal mit 50 mM Imidazol-Puffer gewaschen und in 1 - 2 ml desselben Puffers resuspendiert. Dieser Suspension wurde ein Aliquot entnommen, das eine Proteinmenge von 1 mg enthielt. Die Zellen wurden sedimentiert und in 0,5 ml Lysozym-Puffer (wie unter 4. beschrieben; aerob, ohne DTE und Resazurin) resuspendiert, dem 20 mg Lysozym /ml Puffer beigegeben worden war. Nach 1,5 h Inkubation bei 37°C und einem weiteren Sedimentationsschritt wurden die Zellen in 100 µl Denaturierungspuffer lysiert (1 h, auf Eis).

Verbleibende Zellbestandteile wurden dann abzentrifugiert (10 min, 14.000 Upm). Die im Überstand gelösten Proteine wurden durch Zugabe von 300 µl eiskaltem Aceton bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt und anschliessend durch Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und verbleibendes Aceton mittels Druckluft entfernt. Das getrocknete Proteinsediment wurde in 120 µl Denaturierungspuffer gelöst. Der Überstand des nachfolgenden Zentrifugationsschrittes (10 min, 14.000 Upm) wurde für die 2D-Gelelektrophorese verwendet.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der ersten Dimension nach dem isoelektrischen Punkt durch isoelektrische Fokussierung in einer Multiphor II Elektrophoreseeinheit (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) in Kombination mit einer EPS 3500 Hochspannungsquelle (Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Auftragen der Proben wurden 180 mm lange „Immobiline Dry Strips“ (pH-Gradient: 4 – 7; Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) die zuvor 16 h in Rehydrierungslösung rehydriert worden waren, in der Elektrophoreseeinheit bei 500 V (1 mA, 5 W) für 1 h vorfokussiert. Anschliessend wurden die Proteinproben an der kathodischen (sauren) Seite aufgetragen. Nach einem Vorlauf von 1 h bei einer Spannung von 500 V (1 mA, 5 W) erfolgte die eigentliche Fokussierung bei einer Spannung von 3500 V (1 mA, 5 W) für 14 - 16 h. Die Elektrophoreseeinheit wurde im Verlauf der gesamten Fokussierung mittels eines Kryostaten auf  $16^{\circ}\text{C}$  temperiert.

In der zweiten Dimension wurden die Proteine in 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen (Schägger und von Jagow, 1987) ihrer Größe nach aufgetrennt. Dazu wurden die „Immobiline Dry Strips“ zunächst je 15 min in 100 ml Äquilibriumspuffer I und II unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluß wurden die Streifen an beiden Ende um etwa 1 – 1,5 cm gekürzt, auf das Trenngel aufgelegt und mit 0,8%iger Agarose überschichtet, der zur Markierung der Lauffront eine Spatelspitze Bromphenolblau zugegeben wurde. Nachdem die Proteine bei 60 V in das Gel eingelaufen waren, wurde die Elektrophorese für etwa 12 h bei konstant 100 V fortgesetzt. Durch Färben der Gele mit Coomassie Brilliant Blue G250 wurden die aufgetrennten Proteine sichtbar gemacht.

Denaturierungspuffer

Harnstoff	13,5 g
Triton X-100	130 ml
Bio-Lyte 3/10 Ampholyt-Lsg. (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)	500 µl
DTT	250 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 25 ml

Der Puffer wurde in Aliquots von 1 ml bei -20°C gelagert.

Rehydrierungslösung

Harnstoff	12 g
Triton X-100	130 µl
Bio-Lyte 3/10 Ampholyt-Lsg.	500 µl
DTT	50 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 25 ml

Äquibrierungspuffer I

Tris-HCl 0,5M pH 6,8	20 ml
Harnstoff	72 g
Glyzerin (86%)	60 ml
SDS	2 g
DTT	1 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 200 ml

Äquibrierungspuffer II

wie Äquibrierungspuffer I,  
statt DTT 5,5 g Iodacetamid

**7.4 Massenspektrometrie**

Die durch 2D-Gelelektrophorese identifizierte Caffeat-induzierten Proteine wurden aus den Polyacrylamidgelen ausgeschnitten und einer massenspektrometrischen Analyse durch ESI-MS/MS unterzogen. Die Massenspektrometrie wurde freundlicherweise von B. Granvogel (Botanisches Institut der LMU, München) durchgeführt.

**7.5 Expression von *malE*-Fusionsgenen und Aufreinigung von MalE-Fusionsproteinen**

Die Expression von *malE*-Fusionsgenen erfolgte in *E. coli* DH5α bei 37°C in 500 ml LB-Medium, das mit 5 ml einer Vorkultur inokuliert wurde. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,6 wurde die Produktion der MalE-Fusionsproteine durch Zugabe von 0,3 mM IPTG induziert. Nach 3 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (15 min, 5.000 Upm), in 10 ml

Säulenpuffer resuspendiert und in der „French Pressure Cell Press“ bei 1.000 psiG aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden anschliessend durch Zentrifugation (15 min, 5.000 Upm) entfernt. Der Überstand wurde auf eine Amylosesäule (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgetragen, die zuvor mit 1 Säulenvolumen (SV) H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, 3 SV 0,1% SDS, 3 SV H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und 3 SV Säulenpuffer regeneriert worden war. Nach einem Waschschrift (8 SV Säulenpuffer) wurden die MalE-Fusionsproteine mit 16 ml Säulenpuffer, der Maltose in einer Endkonzentration von 10 mM enthielt, von der Säulenmatrix eluiert. Die Fraktionsgrösse betrug etwa 1 ml.

<u>Säulenpuffer</u>	
Tris/HCl	20 mM
NaCl	200 mM
EDTA	1 mM
PMSF	0,1 mM
pH 7,4	

### **7.6 Isolierung von Ferredoxin aus *Clostridium pasteurianum* und *Clostridium tetanomorphum***

Zur Isolierung von Ferredoxin wurde *C. pasteurianum* wie unter 3.3 beschrieben angezogen. Die Zellen wurden nach Erreichen der spätexponentiellen Wachstumsphase mit Hilfe einer Durchlaufzentrifuge geerntet (14.000 Upm; Contifuge Strato, Heraeus, Osterode). 50 g Zellen (Nassgewicht) wurden in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> resuspendiert, mit 500 mg Lysozym und einer Spatelspitze DNase I versehen und 1,5 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschliessend erfolgte der Aufschluss der Zellen in der „French Pressure Cell Press“ (800 psiG; SLM Amico; SLM Instruments, Rochester, NY, USA). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (45 min, 15.000 Upm, 4°C). Der pH-Wert des erhaltenen zellfreien Extraktes wurde mit 1 M Tris auf 6,5 eingestellt. Anschliessend wurde unter kontinuierlichem Rühren 1,2 ml eiskaltes Azeton/g zellfreiem Extrakt zugegeben. Die Endkonzentration betrug 55% Azeton [v/v]. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation sedimentiert (15 min, 15.000 Upm) und der Ferredoxin-haltige Überstand wurde in einen JA-10-Zentrifugenbecher überführt. Zur Fällung des Ferredoxins wurde unter kontinuierlichem Rühren Polyethylenimin (10% [w/w], pH 6,5) zugegeben (50 µl/g Azetonüberstand; Endkonzentration: 0,5% Polymin

[v/w]). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (20 min, 15.000 Upm) wurde das erhaltene braune Sediment unter kräftigem Rühren in 10 ml 60% Ammoniumsulfat resuspendiert. Ungelöste Anteile wurden durch Zentrifugation entfernt (10 min, 30.000 Upm). Der erhaltene bräunliche, klare Überstand wurde anschliessend auf eine 7-ml-DEAE-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 45 ml gewaschen. Das an die DEAE-Zellulose gebundene Ferredoxin wurde mittels eines Ammoniumsulfat-Gradienten (0 – 90%) eluiert. Die Fraktionsgrösse betrug 5 ml. Die Reinheit der Ferredoxin-Lösung wurde photometrisch überprüft, wobei der Quotient 390 nm/280 nm zwischen 0,76 und 0,79 liegen sollte (Schönheit *et al.*, 1978).

Das in den unter 4.1.5 beschriebenen Versuchen verwendete Ferredoxin von *C. tetanomorphum* wurde von Elamparithi Jayamani (Universität Marburg) aufgereinigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

## **8. Immunologische Methoden**

### **8.1 Herstellung polyklonaler Antiseren**

Die Herstellung polyklonaler Antiseren erfolgte durch DaBio Biotechnologie, Regensburg. Dazu wurden einem Kaninchen 0,5 – 1 mg eines über eine Amylosesäule aufgereinigten MalE-Fusionsproteins (siehe 7.5) injiziert. Das Antiserum wurde nach 10 bis 12 Wochen quantitativ entnommen und in entsprechenden Mengen für Western-Blot Analysen eingesetzt.

### **8.2 Western-Blot**

Zur immunologischen Analyse von Proteinen wurden diese zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Als Grössenstandard diente dabei die „Prestained Protein Ladder“ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Der Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen (Protran Nitrocellulose Transfer Membrane; Schleicher und Schuell, Dassel) erfolgte in einer „Semidry Electroblothing Kammer“ (Biometra, Göttingen) nach folgendem Aufbau (beginnend bei der Anode): 6 Lagen Whatman-Papier, äquilibriert in Anoden-Puffer I; 3 Lagen Whatman-Papier, äquilibriert in Anoden-Puffer II; Nitrocellulose-Membran, äquilibriert in

Anoden-Puffer II; SDS-Polyacrylamidgel, äquibriert in Kathoden-Puffer; 6 Lagen Whatman-Papier, äquibriert in Kathoden-Puffer.

Der Protein-Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von  $1 \text{ mA/cm}^2$  Polyacrylamidgel für 1 h.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Nitrocellulose-Membranen anschliessend für 12 h in PBST mit 2% BSA unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membranen mit PBST wurden 1 – 5  $\mu\text{l}$  des polyklonalen Antiserums zugegeben. Nach einer Inkubation von 3 h wurden die Nitrocellulose-Membranen erneut dreimal für 10 min mit PBST gewaschen und anschliessend für 1 h mit einem Protein A-Meerrettichperoxidase-Konjugat (4 $\mu\text{l}$ /20 ml PBST) inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten (je 10 min in PBST) erfolgte der Nachweis der immunologischen Reaktion mit Hilfe des Lumi-Light $plus$  Western Blotting Substrate-Kits (Roche, Mannheim) gemäß der Anleitung des Herstellers. Bei der Verwendung von Detektionslösungen eigener Herstellung wurden die Nitrocellulose-Membranen (9 cm x 7 cm) zwei Minuten in 4 ml Lösung A, 400  $\mu\text{l}$  Lösung B und 1,5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (35%) inkubiert. Die Dokumentation der Chemiluminiszenz erfolgte anschliessend durch die Belichtung von Röntgenfilmen.

<u>PBST (20x)</u>		<u>Anodenpuffer I</u>	
NaCl	163,63 g	Tris	18,17 g
KCl	14,9 g	MeOH	100 ml
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	18,2 g	$\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ ad	500 ml
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5,44 g		
TWEEN 20	1 %		
<u>Anodenpuffer II</u>		<u>Kathodenpuffer</u>	
Tris	1,51 g	Tris	1,51 g
MeOH	100 ml	6-Aminohexansäure	2,6 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ ad	500 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ ad	500 ml
		pH 9,4	

### Detektionslösungen

Lösung A:      200 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,6  
                  50 mg 5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazinedion

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert

Lösung B:      11 mg *p*-Hydroxycoumarsäure  
                  in 10 ml DMSO

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert.

## **9. Chemikalien und Gase**

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Fluka, Sigma-Aldrich, Roth, Roche oder Boehringer Mannheim bezogen. Gase und Gasgemische wurden von Air Liquide, Frankfurt/Griesheim bezogen.

## Experimente und Ergebnisse

### 1. Untersuchungen zur H<sub>2</sub>-abhängigen Caffeatreduktion in zellfreien Systemen

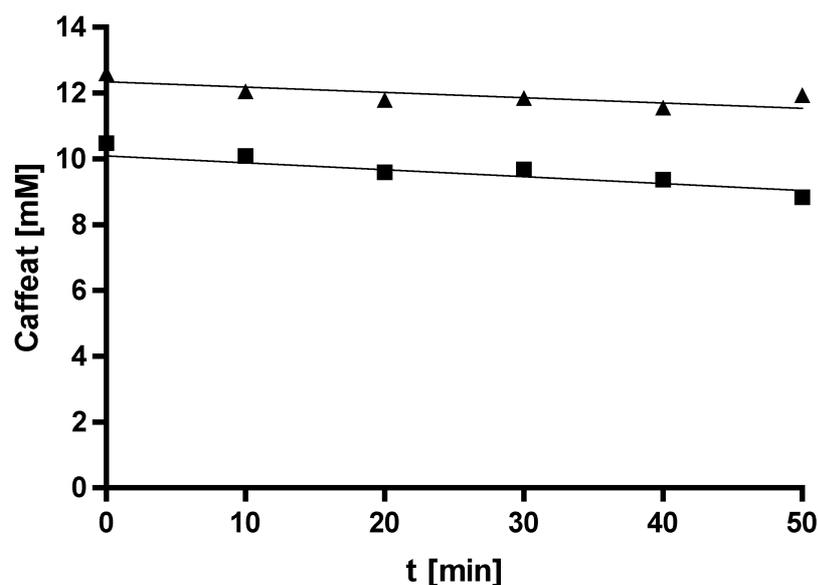
Die Nutzung alternativer terminaler Elektronenakzeptoren stellt für acetogene Bakterien eine zusätzliche Möglichkeit dar, Energie zu konservieren. In Analogie zur autotrophen CO<sub>2</sub>-Reduktion im Wood-Ljungdahl-Weg wird bei der H<sub>2</sub>-abhängigen Caffeatreduktion in *A. woodii* Energie nach einem chemiosmotischen Mechanismus konserviert (Imkamp und Müller, 2002). Na<sup>+</sup> fungiert dabei als Kopplungsign. Im Zuge des Elektronentransfers vom Donor H<sub>2</sub> zum terminalen Akzeptor Caffeat wird ein primärer transmembraner Gradient generiert, der die Anwesenheit eines oder mehrerer membranständiger, Na<sup>+</sup>-translozierender Enzyme erfordert. Detaillierte Kenntnisse über die Mechanismen und Komponenten des Elektronentransports von H<sub>2</sub> zu Caffeat oder über Enzyme, die dabei die Generierung des Na<sup>+</sup>-Gradienten bewerkstelligen, lagen bisher allerdings nicht vor. Im Vordergrund der nachfolgenden Versuche stand die Charakterisierung der Reaktionssequenz H<sub>2</sub> + Caffeat → Hydrocaffeate. Dazu wurden die enzymatischen Aktivitäten mit potentieller Relevanz für H<sub>2</sub>-abhängige Caffeatreduktion charakterisiert und ihre zelluläre Lokalisierung untersucht. Dadurch sollten Hinweise auf Reaktionsschritte erhalten werden, die mit der Translokation von Na<sup>+</sup> einhergehen könnten. Die Versuche wurden mit zellfreien Extrakten und daraus hergestellten Präparationen der Cytoplasma- und Membranfraktion von *A. woodii* durchgeführt.

#### 1.1 H<sub>2</sub>-abhängige Caffeatreduktion in zellfreiem Rohextrakt

Zunächst wurde das Verfahren zur Herstellung zellfreier Rohextrakte von *A. woodii* unter strikt anaeroben Bedingungen etabliert. Da die Hydrogenase konstitutiv produziert wird, war für die Herstellung der Extrakte eine Anzucht unter chemolithoautotrophen Bedingungen nicht notwendig. Aus gewaschenen, Fruktose-gezogenen Zellen von *A. woodii* wurden durch Behandlung mit Lysozym zunächst Protoplasten hergestellt, die durch 420 mM Saccharose im Aufschluß-Puffer osmotisch stabilisiert wurden (Heise, 1992). Der anschließende Zellaufschluß mittels der „French Press“ erfolgte bei niedrigem Druck (650 PsiG). Dadurch sollte ein Abscheren membranständiger Komponenten verhindert werden. Zur Entfernung von Zelltrümmern folgten zwei niedertourige Zentrifugationsschritte. Der erhaltene Überstand

wurde als Rohextrakt bezeichnet. Aliquots des Rohextraktes wurden anschliessend auf die Fähigkeit untersucht, Caffeat mit  $H_2$  als Elektronendonator zu reduzieren. Da in Versuchen mit Suspensionen ruhender Zellen die strikte  $Na^+$ -Abhängigkeit der  $H_2$ -abhängigen Caffeatreduktion gezeigt worden war (Imkamp und Müller, 2002), wurden die Ansätze standardmäßig mit 10 mM NaCl supplementiert. Caffeat wurde in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben.

Wie in Abb. 5 dargestellt, war der so hergestellte Rohextrakt nicht in der Lage, Caffeat zu reduzieren. In Gegenwart von  $H_2$  als Elektronendonator war die spezifische Reduktion mit 1,1 nmol/min x mg Protein nur geringfügig höher als im Kontroll-Ansatz, der ohne Elektronendor unter einer  $N_2$ -Atmosphäre inkubiert worden war (0.96 nmol Caffeat/min x mg Protein). Um toxische Effekte durch das Phenylacrylat auszuschliessen, wurde der Versuch mit geringeren Caffeatkonzentrationen wiederholt. Auch dabei konnte keine Erhöhung der Reduktionsraten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



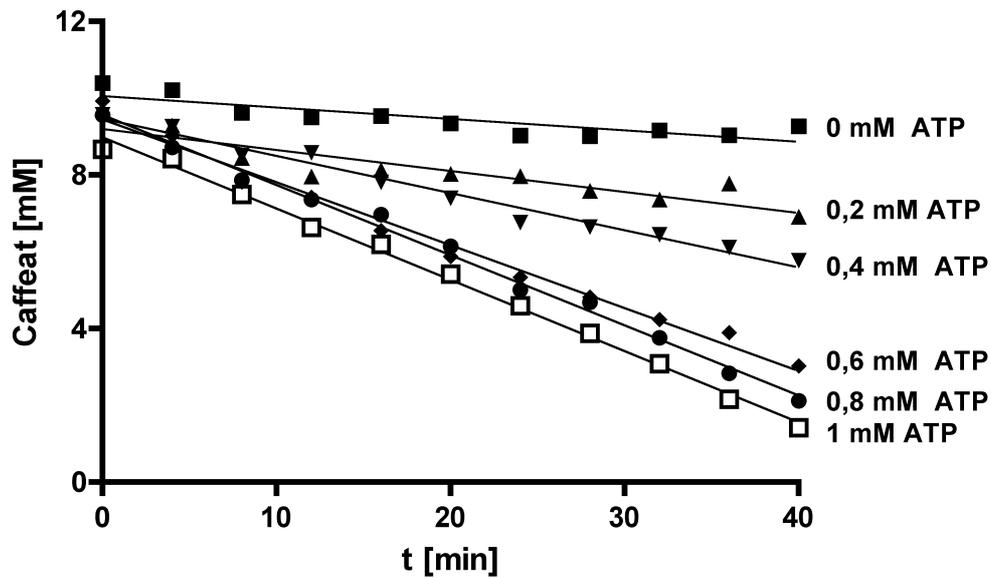
**Abb. 5. Untersuchung der  $H_2$ -abhängigen Caffeatreduktion in zellfreiem Rohextrakt von *A. woodii*.** Aliquots (500  $\mu$ l) zellfreien Rohextrakts (26,3 mg Protein/ml) wurden in einem Schüttelwasserbad bei 30°C 10 min in Gegenwart von 10 mM NaCl unter einer  $H_2$ - (■) oder einer  $N_2$ -Atmosphäre (▲) inkubiert. Zum Zeitpunkt t = 0 min erfolgte die Zugabe von 10 mM Caffeat. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben von 25  $\mu$ l entnommen und die Caffeatkonzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 312 nm bestimmt.

In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für eine Stimulierung enzymatischer Reaktionen in zellfreien Systemen durch ATP, die *in vivo* kein ATP benötigen. So ist in zellfreien Extrakten von *Sporomusa ovata* die Bildung von Methyl-Tetrahydrofolat aus Methanol oder methoxylierten, aromatischen Verbindungen abhängig von katalytischen

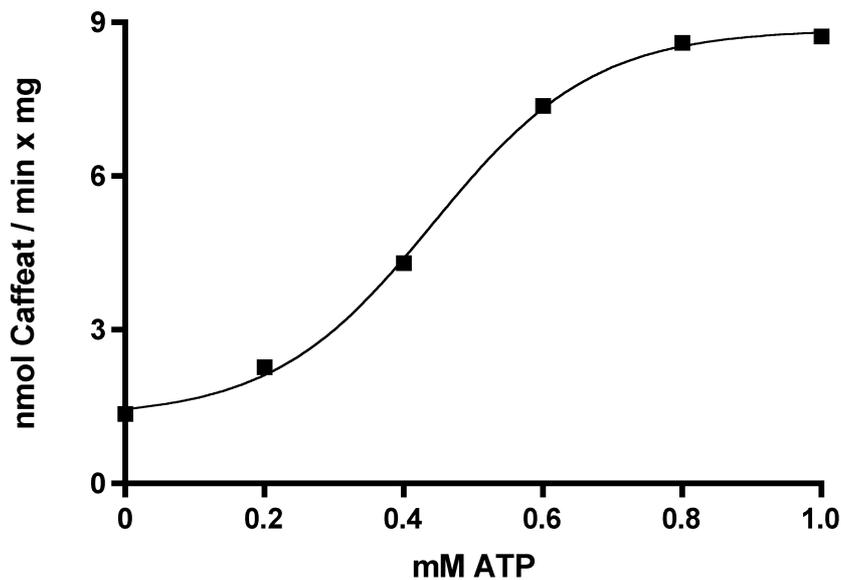
Mengen ATP (Stupperich und Konle, 1993). In Rohextrakten von *Methanobacterium thermoautotrophicum* und *Methanosarcina barkeri* wird der Methylgruppentransfer von Methyl-Tetrahydromethanopterin auf Coenzym M durch ATP aktiviert (Kengen *et al.*, 1988; van de Wijngaard *et al.*, 1991). Daher sollte der Effekt von ATP auf die H<sub>2</sub>-abhängige Caffeatreduktion in Rohextrakten von *A. woodii* untersucht werden.

Wie in Abb. 6 A zu sehen, stimuliert ATP die H<sub>2</sub>-abhängige Caffeatreduktion. Eine Sättigung wurde bei 1 mM ATP erreicht. Unter diesen Bedingungen betrug die spezifische Reduktionsrate 8,7 nmol Caffeate/min x mg Protein. Dies entspricht rund 20% der für Suspensionen ruhender Zellen beschriebenen Rate (Imkamp und Müller, 2002). In allen nachfolgenden Versuchen wurde ATP daher stets im Überschuß (2 – 4 mM) zugegeben. Zum Teil konnten höhere Reduktionsraten beobachtet werden. Dies korrelierte allerdings nicht mit dem Überschuß an ATP, sondern unterlag präparatorisch bedingten Schwankungen. Die Zugabe von Ti-(III)-Citrat, einem starken Reduktionsmittel, anstelle von ATP führte zu keiner Stimulierung der H<sub>2</sub>-abhängigen Caffeatreduktion im zellfreien Rohextrakt (Daten nicht gezeigt).

A.



B.

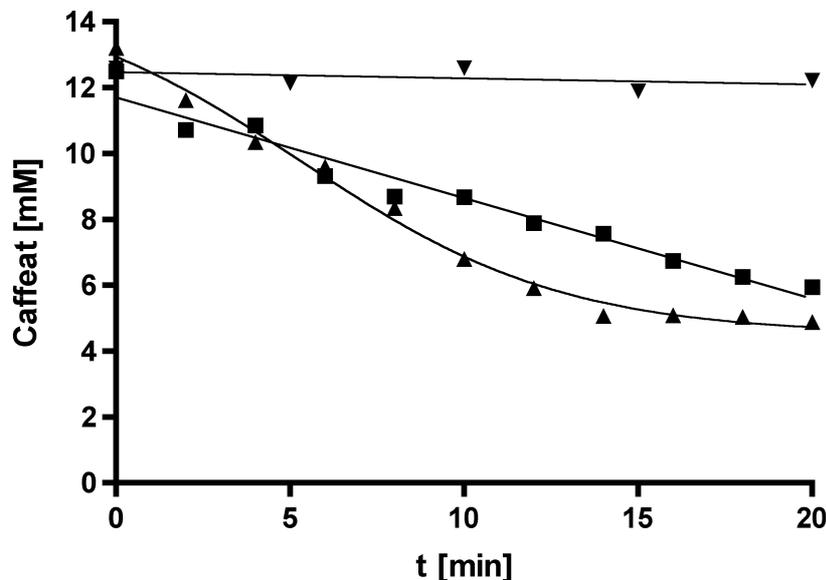


**Abb. 6.** A. Stimulierung der  $H_2$ -abhängigen Caffeatreduktion durch ATP in zellfreien Rohextrakten von *A. woodii*. Aliquots (500  $\mu$ l) einer Präparation zellfreien Rohextraktes (21,2 mg Protein/ml) wurden unter einer  $H_2$ -Atmosphäre bei 30°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Die Ansätze wurde mit 10 mM NaCl und ansteigenden Konzentrationen ATP supplementiert. Die Zugabe von 10 mM Caffeate erfolgte zum Zeitpunkt  $t = 0$  min. Die Caffeatekonzentration der entnommenen Proben wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 312 nm bestimmt. B. ATP-Abhängigkeit der  $H_2$ -abhängigen Caffeatreduktion im Rohextrakt. Aufgetragen sind die spezifischen Aktivitäten der Ansätze aus Abb. 6 A gegen die ATP-Konzentration.

## 1.2 Die zelluläre Lokalisation der H<sub>2</sub>-abhängigen Caffeatreduktion

Im Folgenden wurde zellfreier Rohextrakt von *A. woodii* durch Ultrazentrifugation in Cytoplasma und Membranen getrennt, und die Fähigkeit der Fraktionen Caffeat mit H<sub>2</sub> als Elektronendonator zu reduzieren, wurde untersucht.

Die spezifische Aktivität der H<sub>2</sub>-abhängigen Caffeatreduktion betrug im zellfreien Rohextrakt 18,7 nmol/min x mg Protein (Abb. 7). Überraschend war die Beobachtung, dass die Aktivität der cytoplasmatischen Fraktion nur rund 27% geringer war als die des Rohextraktes (11,8 nmol/min x mg Protein). Die Supplementierung des Cytoplasmas mit verschiedenen Mengen der Membranfraktion führte zu keiner weiteren Stimulierung der Caffeatreduktion (Daten nicht gezeigt). Die Membranfraktion war dagegen nicht in der Lage eine H<sub>2</sub>-abhängige Caffeatreduktion zu vermitteln.



**Abb. 7. Die H<sub>2</sub>-abhängige Caffeatreduktion erfolgt in Abwesenheit von Membranen.** Zellfreier Rohextrakt (32,5 mg Protein/ml) wurde durch Ultrazentrifugation in Cytoplasma (25,9 mg Protein/ml) und Membranen (20,25 mg Protein/ml) getrennt. Ein Aliquot von 500 µl einer jeden Fraktion wurde in einem Schüttelwasserbad bei 30°C in Gegenwart von 10 mM NaCl und 2 mM ATP für 10 min unter einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von Caffeat in einer Endkonzentration von 10 mM (Zeitpunkt t = 0 min). Die Caffeatkonzentration der entnommenen Proben wurde photometrisch bestimmt. (▲), zellfreier Rohextrakt; (■), Cytoplasmafraktion; (▼), Membranfraktion.

Dieser Befund war überraschend, da die Gesamtreaktion in ganzen Zellen mit der Na<sup>+</sup>-Translokation über die Cytoplasmamembran einhergeht, also mindestens ein membranständiger Reaktionsschritt erforderlich ist. Für die ausschließliche Lokalisierung der Aktivität in der cytoplasmatischen Fraktion können zwei mögliche Erklärungen herangezogen werden. Im Cytoplasma kann unter *in vitro*-Bedingungen die Caffeatreduktion durch Enzyme

katalysiert werden, die *in vivo* keine Rolle spielen. Eine Stimulierung der Aktivität durch Membranen wäre dann allerdings dennoch zu erwarten. Andererseits könnten trotz des schonenden Zellaufschlusses Komponenten von der Membran abgeschert worden sein, die dann im Cytoplasma zusammen mit löslichen Enzymen eine H<sub>2</sub>-abhängige Caffeatreduktion ermöglichen.

Ein großes Problem bei den Untersuchung im zellfreien System stellte generell die Reproduzierbarkeit sowohl der H<sub>2</sub>-abhängigen Caffeatreduktion in Rohextrakten, als auch der Cytoplasmafraktionen dar. In Wachstumsversuchen mit *Acinetobacter* sp. ADP1 zeigten PARKE und ORNSTON (2004), dass Caffeat-Derivate, die durch Oxidation der Verbindung entstehen, offenbar toxisch sind. Minimalmedium, das Caffeat enthielt, wurde für 48 h bei 37°C ohne Zellen vorinkubiert. Dabei wurde das Phenylacrylat durch Oxidation in eine braungefärbte Verbindung überführt („oxidative browning“). Wurde *Acinetobacter* sp. ADP1 in Medium inkubiert, das umgewandeltes Caffeat enthielt, nahm die Zahl lebensfähiger Zellen innerhalb kürzester Zeit ab. Die Umwandlung von Caffeat durch „oxidative browning“ kann bei Anzuchten von *A. woodii* ausgeschlossen werden, da diese im Gegensatz zu *Acinetobacter* anaerob erfolgen. Möglicherweise entstanden toxische Caffeat-Derivate bei der Herstellung der Stammlösungen, aus denen die Kulturen zur Induktion der Reduktionsaktivität supplementiert wurden. Die freie Säure Caffeat ist in Wasser nur schlecht löslich. Um eine 100 mM, wässrige Caffeat-Stammlösungen herzustellen, mussten große Mengen KOH zugegeben werden, damit die Chemikalie bei einem pH von etwa 7,3 vollständig in Lösung ging. Denkbar wäre daher, dass das Caffeat durch die Zugabe des KOH in toxische Derivate überführt wird, welche die Induktion von Komponenten, die zur Caffeatreduktion benötigt werden, inhibiert. Dagegen spricht allerdings, dass die Verwendung von in DMSO gelöstem Caffeat zu keiner Verbesserung der Reproduzierbarkeit führte. Caffeat ist in DMSO sehr gut löslich und eine Titration des pH-Wertes mit KOH war demnach nicht notwendig. Ein inhibitorischer Effekt des DMSO konnte ausgeschlossen werden.

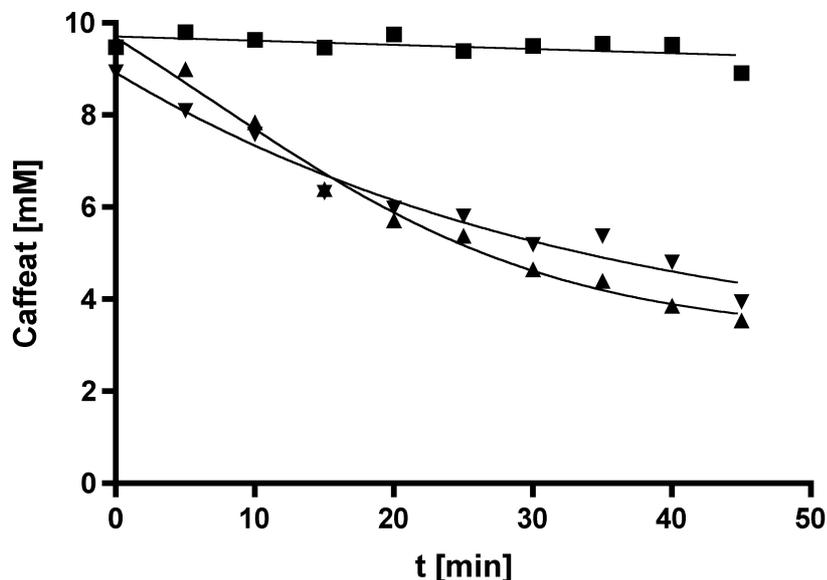
### 1.3 Alternative Elektronendonatoren für die Caffeatreduktion im zellfreien System

In den vorangegangenen Versuchen wurde die Gesamtreaktion  $\text{H}_2 + \text{Caffeat} \rightarrow \text{Hydrocaffeat}$  untersucht. Nun sollten die an dieser Reaktionssequenz beteiligten enzymatischen Reaktionen unabhängig voneinander untersucht werden. Im Vordergrund stand dabei zunächst die Caffeat-reduzierende Aktivität, die durch eine

unbekannte terminale Reduktase vermittelt wird. Um eine Charakterisierung der hypothetischen Caffeate-Reduktase *per se* vornehmen zu können, wird ein Donor benötigt, der Elektronen direkt auf das Enzym überträgt.

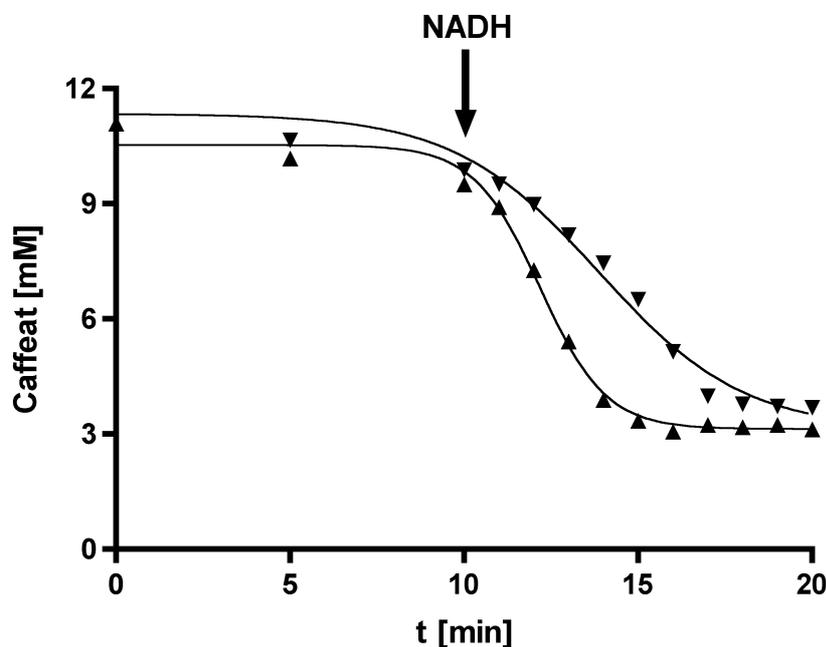
TMPD, 1,5-Diphenylcarbazid, Methylviologen, das mit Ti-(III)-Citrat vorreduziert worden war und Phenylendiamin wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, als artifizielle Elektronendonatoren für Caffeatreduktion zu fungieren. Aliquots von zellfreiem Rohextrakt, der Cytoplasma- oder Membranfraktion wurden unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert und mit einem der artifiziellen Mediatoren, sowie Caffeate in einer Endkonzentration von jeweils 10 mM supplementiert.

Von den eingesetzten artifiziellen Elektronendonatoren war nur *p*-Phenylendiamin in der Lage, Caffeate zu reduzieren. In zellfreiem Rohextrakt wurde eine Aktivität von 8,2 nmol /min x mg Protein und in der cytoplasmatischen Fraktion eine von 9,4 nmol/min x mg Protein bestimmt (Abb. 8). Auch hier konnte, wie schon zuvor mit H<sub>2</sub> als Elektronendonator, keine Aktivität in der Membranfraktion beobachtet werden. Eine rein chemische Reduktion des Caffeates durch *p*-Phenylendiamin konnte durch Kontroll-Ansätze, die nur Versuchs-Puffer enthielten, ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).



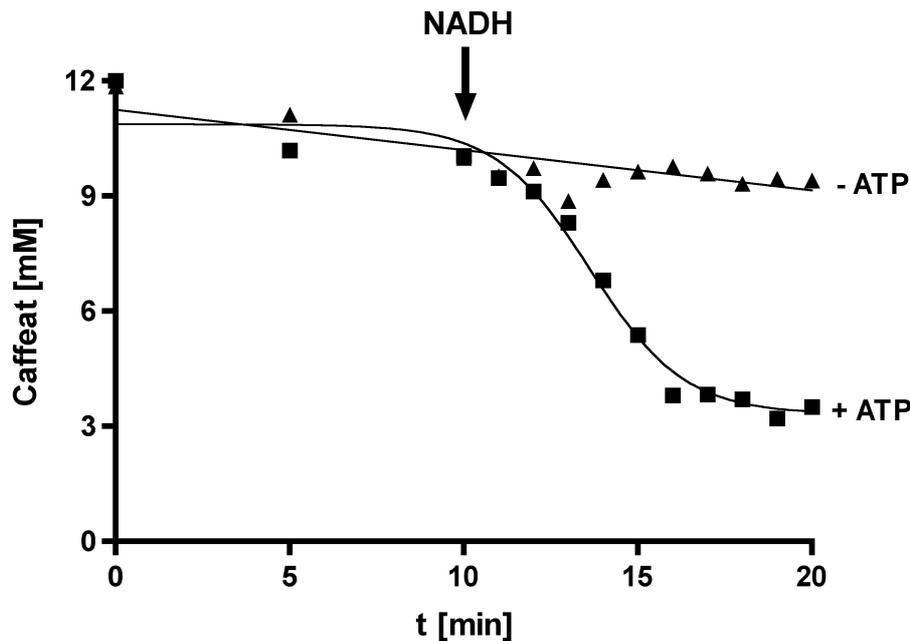
**Abb. 8. Phenylendiamin-abhängige Caffeatreduktion im Rohextrakt und Cytoplasma von *A. woodii*.** Je 500 µl zellfreier Rohextrakt (▲; 33,2 mg Protein/ml), Cytoplasma- (▼; 21,3 mg Protein/ml) oder Membranfraktion (■; 32,8 mg Protein/ml) wurden unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 30°C in einem Schüttelwasserbad in Gegenwart von 10 mM NaCl, 2 mM ATP und 10 mM Phenylendiamin 10 min inkubiert. Die Ansätze wurden dann mit Caffeate in einer Endkonzentration von 10 mM supplementiert. Die Caffeatekonzentration der zu den angegebenen Zeitpunkten entnommenen Proben wurde photometrisch bestimmt.

Neben artifiziellen Mediatoren wurde NADH als physiologischer Elektronendonator für die Caffeatreduktion überprüft. Dazu wurden Aliquots von zellfreiem Rohextrakt, Cytoplasma- oder Membranfraktion unter einer  $N_2$ -Atmosphäre in Gegenwart von 10 mM Caffeat inkubiert. Die Zugabe von NADH (10 mM) zu zellfreiem Rohextrakt führte zu einer raschen Abnahme der Caffeatkonzentration (Abb. 9). Die spezifische Aktivität betrug im dargestellten Fall 23,75 nmol/min x mg Protein. Wie in den vorherigen Untersuchungen konnte keine Aktivität in der Membranfraktion beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die NADH-abhängige Caffeatreduktion war ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert, die spezifische Aktivität betrug 38,8 nmol/min x mg Protein.



**Abb. 9.** NADH-abhängige Caffeatreduktion im Rohextrakt und Cytoplasma von *A. woodii*. 500  $\mu$ l Rohextrakt (▲; 39 mg Protein/ml) oder Cytoplasma (▼; 37,2 mg Protein/ml) wurden in Gegenwart von 2 mM ATP und 10 mM NaCl mit Caffeat in einer Endkonzentration von 10 mM supplementiert und bei 30°C inkubiert. Zum Zeitpunkt t = 10 min erfolgte die Zugabe von 10 mM NADH (Pfeil). Die Caffeatkonzentration der zu den angegebenen Zeitpunkten entnommenen Proben wurde photometrisch bestimmt.

Die NADH-abhängige Caffeatreduktion war wie die Caffeatreduktion mit  $H_2$  als Elektronendonator strikt abhängig von der Gegenwart von ATP (Abb. 10).



**Abb. 10.** Die NADH-abhängige Caffeatreduktion in zellfreiem Rohextrakt ist ATP-abhängig. 500  $\mu$ l zellfreier Rohextrakt (39 mg Protein/ml) wurden in Gegenwart von 2 mM ATP (+ATP) oder ohne ATP (-ATP) und 10 mM NaCl mit Caffeate in einer Endkonzentration von 10 mM supplementiert und bei 30°C inkubiert. Zum Zeitpunkt  $t = 10$  min erfolgte die Zugabe von 10 mM NADH (Pfeil). Die Caffeatkonzentration der zu den angegebenen Zeitpunkten entnommenen Proben wurde photometrisch bestimmt.

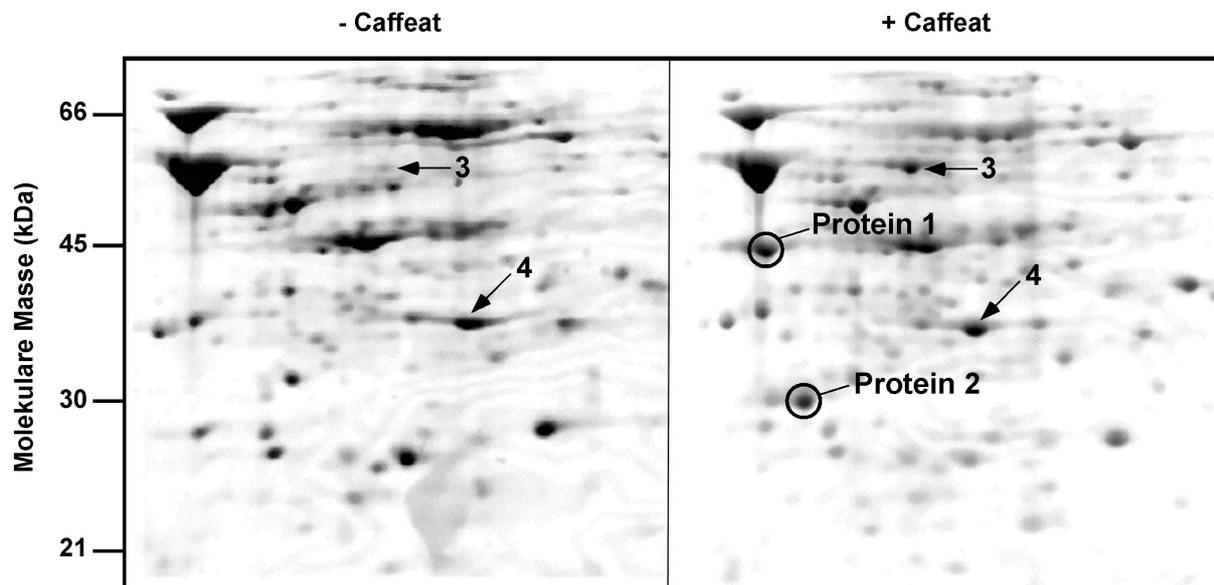
Durch die beschriebenen Experimente konnte gezeigt werden, dass die Caffeatreduktion mit  $H_2$  als Elektronendonator offensichtlich durch cytoplasmatische Enzyme katalysiert wird. Als Elektronendonatoren wurden  $NADH + H^+$  und Phenylendiamine identifiziert. Gerade letzteres würde sich für einen Aktivitätsassay im Verlauf einer Aufreinigung des Caffeatreduzierenden Enzyms anbieten. Membranen stimulierten die  $H_2$ -abhängige Caffeatreduktion offenbar nicht.

Im Folgenden sollten Proteine, die an der Caffeatreduktion beteiligt sind, durch vergleichende Analyse des Proteoms von *A. woodii* identifiziert werden.

## 2. Identifizierung und Charakterisierung von EtfA und EtfB

Aus Caffeate-induzierten und nicht-induzierten Zellen wurde das Gesamtprotein isoliert und mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Polyacrylamidgele der zweiten Dimension wurden einer Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G250 unterzogen und anschliessend verglichen. In 8 unabhängig voneinander durchgeführten Analysen waren die Proteine 1 und 2 nur in Zellen zu finden, die in Gegenwart von Caffeate gewachsen waren (Abb.11). Andere

Proteine, wie z. B. Protein 3 wurden in Gegenwart von Caffeat verstärkt produziert oder ihre Konzentration nahm ab (Protein 4). Dies konnte allerdings nicht in allen Fällen beobachtet werden.



**Abb. 11. Identifikation Caffeat-induzierter Proteine durch 2D-Gelelektrophorese.** 50-ml-Kulturen von *A. woodii* wurden mit 20 mM Fruktose in Gegenwart oder Abwesenheit von Caffeat (10 mM) angezogen. Das Gesamtprotein der Zellen wurde isoliert und mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dargestellt ist ein Ausschnitt der Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgele der zweiten Dimension.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die induzierten Proteine 1 und 2 aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und massenspektrometrisch durch ESI-MS/MS analysiert. Die dadurch erhaltenen zwischen 9 und 17 Aminosäuren langen Peptidsequenzen wurden mit Proteinen in der NCBI-Datenbank verglichen. In Abb. 12 sind jeweils eine repräsentative Peptidsequenz der induzierten Proteine 1 und 2 sowie je 11 Teilsequenzen von Proteinen mit den höchsten Übereinstimmungen dargestellt. Der Vergleich zeigte, dass es sich bei den induzierten Proteinen um die Untereinheiten  $\alpha$  (Protein 1) und  $\beta$  (Protein 2) eines Elektronentransfer-Flavoproteins (ETFP) handeln könnte. ETFP spielen bei Pro- und Eukaryonten im Rahmen von verschiedenen Oxidations- und Reduktionsreaktionen eine wichtige Rolle als Elektronenüberträger (Tsai und Saier Jr., 1995; Hetzel *et al.*, 2003). Die Caffeat-induzierten Proteine aus *A. woodii* wurden im Folgenden mit EtfA (Protein 1) und EtfB (Protein 2) bezeichnet.

Organismus		Sequenz		Annotation
<b>Protein 1</b>	A.w.	<b>GVWVFAEQR</b>		
	C.b.	8	<b>GVWVFAEQR</b>	16 EtfA
	C.t.	8	<b>GVWVFAEQR</b>	16 EtfA
	C.s.	8	<b>GVWVFAEQR</b>	16 EtfA
	C.a.	8	<b>GVWVFAEQR</b>	16 EtfA
	S.f.	8	<b>GIWIFAEQR</b>	16 EtfA
	A.m.	71	<b>GIWVFAEQR</b>	79 EtfA
	G.m.	113	<b>GVWVFVEQT</b>	201 EtfA
	T.t.	6	<b>DIWIFAEQR</b>	14 EtfA
	P.g.	8	<b>GVFVFAEQR</b>	16 EtfA
	G.s.	7	<b>GVWVFIEQT</b>	15 EtfA
	T.te.	6	<b>DIWVFVEQR</b>	14 EtfA
<b>Protein 2</b>	A.w.	<b>LAMGADEAYLISDR</b>		
	S.s.	77	<b>LAMGIDEAYLISDR</b>	90 EtfB
	S.a.	77	<b>LAMGIDEAYLISDR</b>	90 EtfB
	S.t.	76	<b>IAMGADEAYLITDR</b>	87 EtfB
	T.t.	74	<b>LAMGADEAYLLTDR</b>	87 EtfB
	M.e.	75	<b>LAMGADDAYLLSDR</b>	88 EtfB
	T.te.	74	<b>LAMGADEAYLLSDK</b>	87 EtfB
	C.t.	74	<b>LSMGADEAILISDR</b>	87 EtfB
	B.f.	74	<b>LAMGADEAVLITDR</b>	87 EtfB
	G.s.	74	<b>LAMGADEAILCSDR</b>	87 EtfB
	C.a.	74	<b>LAMGADEAVLLTDR</b>	87 EtfB
	S.f.	78	<b>LSMGADDAILCSDR</b>	91 EtfB

**Abb. 12. Identifikation der Caffeat-induzierten Protein 1 und 2 aus *A. woodii*.** Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Peptidsequenz der induzierten Proteine 1 und 2. Als Referenzen sind je 11 Teilsequenzen von Proteinen mit den höchsten Übereinstimmungen gezeigt. Die Zahlen links und rechts der Sequenzen geben die Position der Aminosäuren im Protein an. EtfA, Elektronentransfer-Flavoprotein, Untereinheit  $\alpha$ ; EtfB, Elektronentransfer-Flavoprotein, Untereinheit  $\beta$ . A.w., *Acetobacterium woodii*; A.m., *Alkaliphilus metalliredigens*; B.f., *Butyrovibrio fibrisolvens*; C.a. *Clostridium acetobutylicum*; C.b. *Clostridium beijerinckii*; C.s. *Clostridium saccharobutylicum*; C.t., *Clostridium tetani*; G.m., *Geobacter metallireducens*; G.s., *Geobacter sulfurreducens*; M.e., *Megasphaera elsdenii*; P.g., *Porphyromonas gingivalis*; S.a., *Sulfolobus acidocaldarius*; S.f., *Syntrophobacter fumaroxidans*; S.s., *Sulfolobus sulfataricus*; S.t., *Sulfolobus tokodii*; T.t., *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*; T.te., *Thermoanaerobacter tengcongensis*.

## 2.1 Klonierung von *etfA* und *etfB*

Um weitere Informationen über EtfA und EtfB zu erhalten, sollten die dafür kodierenden Gene mittels PCR amplifiziert werden. Um möglichst große Fragmente zu erhalten, wurden alle aus der ESI-MS/MS-Analyse erhaltenen Peptidsequenzen bekannten Sequenzen zugeordnet und entsprechende degenerierte Oligonukleotide abgeleitet. In Abb. 13 ist

exemplarisch ein Vergleich von EtfA und EtfB aus *A. woodii* mit den jeweiligen Proteinen aus *C. tetani* und *B. fibrisolvens* dargestellt.

### EtfA *C. tetani*

**EtfA\_forward** →

1 MNIADYK **GVVVF**AEQR **LFPVVF**ELLGEGKK  
 69 AQNPLLSHYTTDGYTKVICDLVAEEKPEIILVGATYIGRDLGPRVAARLRTGLTADCTALDVEEGTNN  
 131 LLMTRPAFGGNLMATIVCGEHRPQMSTVVRPGVFEKLLKKGADGRKGEIKKIEAKLEMSDRTKVEDVVKIT  
 205 KNVMDIGEAEFLVAGGRGIGSKENFKMLEELAEELLGGNVAGSRAAIDNGWIDKDYQVGQTGKTVRPMV

← **EtfA\_reverse**

273 YIAVGISGAIQHLAGMQSDYIIAINK **DEAAP**IMQI **ADLGLVGD**YN **KIVPELI**AKLKEEKE

### EtfB *B. fibrisolvens*

1 MNIVVCIKQVPDTKGGVKFNPDGTLDRAMLAIMNPDDKAGLEAALRIKDATGAKVTVVTMGLPKADD

**EtfB\_Forward** →

69 MLREAL **LAMGADEAY**LISDR **GGADTWATS**TIAAGLK **PGDTAQVGSQIAQRLQ**  
 ← **EtfB\_reverse**

**MPVVTYVEDIK**

137 LP **VISYA**EDIKVEGDSVIVQRQYEDRYHEIKAKMPCLITALSELNEPRYMTGGVFDADFKEVTVWGR

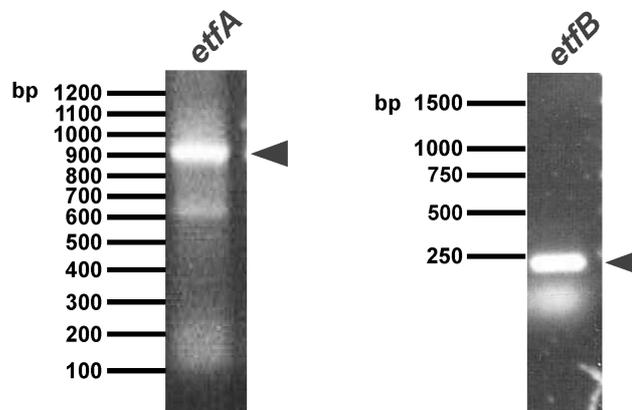
205 DDLKDLDDANIGLAGSPTKIAKASDKVRKGAGEKVALDPQESVNYIVSKLKEKHVI

**Abb. 13. Vergleich der Peptidsequenzen von EtfA und EtfB aus *A. woodii* mit EtfA aus *C. tetani* und EtfB aus *B. fibrisolvens*.** Die aus den ESI-MS/MS-Analysen erhaltenen Peptidsequenzen für EtfA und EtfB aus *A. woodii* (grau unterlegt) sind exemplarisch den Primärsequenzen von EtfA aus *C. tetani* und EtfB aus *B. fibrisolvens* zugeordnet. Zu *A. woodii* identische Reste sind gelb unterlegt. Die für die Ableitung der degenerierten Primer EtfA\_forward/EtfA\_reverse und EtfB\_forward/EtfB\_reverse herangezogenen Sequenzen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Auf Grund dieses Vergleiches wurde für *etfA* ein PCR-Produkt von etwa 930 Bp, für ein *etfB*-Produkt von etwa 210 Bp erwartet.

Um eine möglichst hohe Amplifikationseffizienz zu erreichen, wurde zur Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur zunächst eine Gradienten-PCR durchgeführt. Die

Anlagerungstemperaturen, die die höchsten Produkt-Ausbeuten ergaben (*etfA*: 55°C; *etfB*: 51°C), wurden für eine erneute Amplifikation der Genfragmente herangezogen (Abb. 14)



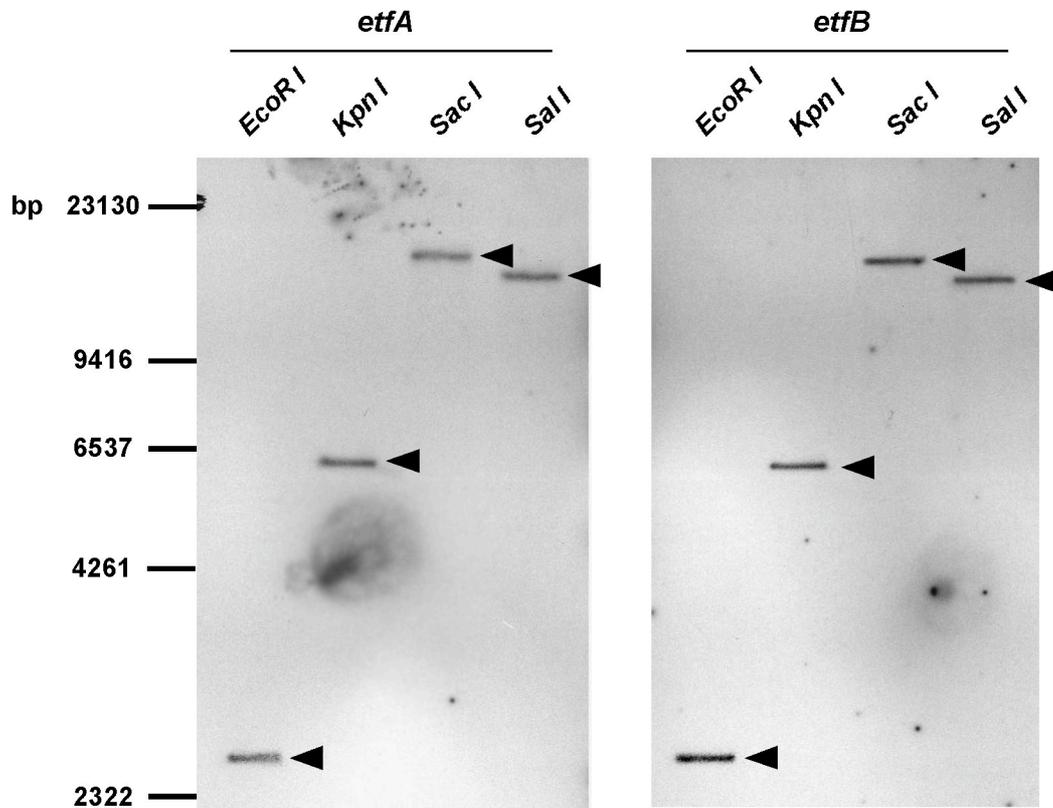
**Abb. 14. Amplifikation der Genfragmente *etfA* und *etfB* aus *A. woodii*.** Fragmente der für EtfA und EtfB kodierenden Gene wurden mit Hilfe degenerierter Oligonukleotide amplifiziert. Als Matrize für die PCR diente chromosomale DNA von *A. woodii*. Aliquots der PCR-Ansätze wurden in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt.

Die Größe der amplifizierten Genfragmente betrug 924 Bp für *etfA* und 213 Bp für *etfB*. Die Genfragmente wurden anschliessend in den Vektor pCR 2.1-TOPO kloniert, und die so erhaltenen Plasmide wurden mit TOPO-*etfA* und TOPO-*etfB* bezeichnet.

## 2.2 Untersuchung der genetischen Organisation von *etfA* und *etfB*

Die für die Untereinheiten von Elektronentransfer-Flavoproteinen kodierenden Gene liegen in der Regel auf dem Chromosom assoziiert vor und werden als eine polycistronische RNA transkribiert. Dabei ist *etfB* zumeist stromaufwärts von *etfA* zu finden (Bedzyk *et al.*, 1993; Chen und Swenson, 1994; Boynton *et al.*, 1996; O'Neill *et al.*, 1998). Die genetische Organisation von *etfB* und *etfA* in *A. woodii* wurde im Folgenden mittels Southern-Blot untersucht. Dazu wurde chromosomale DNA von *A. woodii* isoliert, mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und in einem Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde anschliessend auf eine Nylon-Membran geblottet und mit spezifischen, Digoxigenin-markierten Sonden gegen *etfA* oder *etfB* hybridisiert.

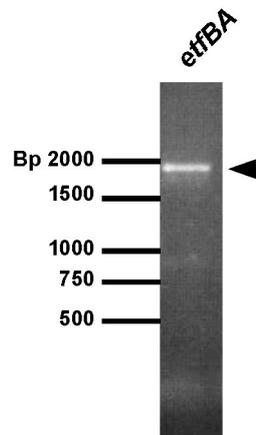
Wie in Abb. 15 zu sehen, hybridisieren die gegen *etfA* und *etfB* generierten Sonden mit Fragmenten restringierter, chromosomaler DNA identischer Größe. Dies läßt auf eine enge räumliche Nähe der beiden Gene auf dem Chromosom schließen.



**Abb. 15. Nachweis der Kolokalisierung von *etfA* und *etfB* durch Southern-Blot.** Chromosomale DNA aus *A. woodii* wurde mit den oben angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten und in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde anschliessend auf eine Nylon-Membran geblottet und mit Digoxigenin-markierten Sonden gegen *etfA* oder *etfB* hybridisiert. Die Visualisierung hybridisierter DNA erfolgte wie unter *Material und Methoden* beschrieben. Die erhaltenen Hybridisierungssignale sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet.

Die Lage von *etfA* und *etfB* zueinander konnte mittels PCR bestimmt werden. Mit den degenerierten Oligonukleotiden EtfB\_forward und EtfA\_reverse konnte ein 1713 Bp großes Fragment amplifiziert werden (Abb. 16). Die Durchführung der PCR mit der Oligonukleotid-Kombination EtfA\_forward/EtfB\_reverse führte dagegen zu keinem Produkt (Daten nicht gezeigt). Das erhaltene Amplifikat wurde in den Vektor pCR 2.1-TOPO kloniert. Das daraus resultierende Plasmid wurde mit TOPO-*etfBA* bezeichnet. Die anschliessende Sequenzierung ergab, dass das Fragment aus einem 561 Bp großen *etfB*-Gensegment besteht, das am 3'-Ende durch 15 Bp nicht kodierender Sequenz von einem 1137 Bp großen *etfA*-Fragment getrennt

wird. Die vollständige Sequenz des 1713 Bp großen *etfB-etfA*-Fragments ist im Anhang dieser Arbeit dargestellt.



**Abb. 16. Amplifikation eines *etfB-etfA*-Fragments.** Mit Hilfe der degenerierten Oligonukleotide *EtfB\_forward/EtfA\_reverse* wurde ein 1713 Bp großes *etfB/etfA*-Fragment amplifiziert. Als Matrize diente chromosomale DNA von *A. woodii*. Aliquots der PCR-Ansätze wurden in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt.

### 2.3 Analyse der Sequenzdaten von *etfA* und *etfB*

Von der Nukleotidsequenz des *etfB-etfA*-Fragments wurde die entsprechende Aminosäuresequenz abgeleitet. Die dadurch erhaltenen Primärsequenzen von *EtfA* und *EtfB* wurden jeweils mit Sequenzen von in Datenbanken hinterlegten Proteinen verglichen.

Die N-Termini von *EtfA*-Proteinen weisen im Allgemeinen nur wenige Übereinstimmungen in der Primärsequenz auf. Dagegen zeichnen sich die C-terminalen Enden durch hohe Übereinstimmung und zahlreiche konservierte Reste aus. Diese sind, wie Untersuchungen an Kristallen des ETFP aus *P. denitrificans* und *Homo sapiens* ergaben, an der Koordinierung des Kofaktors FAD beteiligt (Roberts *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 1999). Ein zweiter Kofaktor, ein AMP-Rest, ist an *EtfB* gebunden. Auch diese Reste sind in allen pro- und eukaryontischen *EtfB*'s hochkonserviert. Anders als bei den *EtfA*-Proteinen sind *EtfB*-Proteine über die gesamte Primärsequenz betrachtet zueinander ähnlich. Die an der Koordinierung des FAD-Kofaktors beteiligten Reste sind auch in der *EtfA*-Sequenz von *A. woodii* zu finden (Abb. 17 A). Vollständig konserviert sind die Aminosäuren, welche in *P. denitrificans* mit dem Isoalloxazin-Rest des FAD in Wechselwirkung treten (Q240, V241, Q243, T244, Q263 und H264; Roberts *et al.*, 1999). Der Ribityl- und der ADP-Rest des FAD werden in *P. denitrificans* durch 10 weitere Aminosäurereste koordiniert. In *EtfA* von

*A. woodii* sind 6 dieser Reste konserviert (S226, R227, S259, N278, K279, D296 in *P. denitrificans*). Der AMP-Kofaktor wird in *P. denitrificans* durch 10 Aminosäurereste des EtfB-Proteins koordiniert. In EtfB aus *A. woodii* sind 2 dieser Reste konserviert (G120 und A123 in *P. denitrificans*; Abb. 17 B).

A.

**EtfA**

		↓	↓		↓↓		↓↓	↓↓	
<b>A.w.</b>		VSGGM	GLGK	PEGFE--	LLKQLADKLG	TVAT	SRAC	VDA	GWADHAQQV
<b>H.s.</b> 219		VSGGR	GLKSGE	NFK--	LLYDLADQLH	AAVGA	SRAA	VDAGF	VPNDMQV
<b>P.d.</b> 197		VSGGR	GLGSKES	F--	IIEELADKLG	AAVGA	SRAA	VDSGY	APNDWQV
<b>B.f.</b> 229		VSGGR	GVGSAE	NFK--	MVEDLAEVL	GGTVS	SRAV	VDSGW	KPKDLQV
<b>C.t.</b> 218		VAGGR	GIGSKEN	F--	MLEEELAE	LGGNV	SRAA	IDNGW	IDKDYQV
<b>G.m.</b> 322		VSGGR	GMLGPE	NFA--	MLQELADE	LGGV	SRAV	DAGW	MPHDRQV
<b>M.t.</b> 221		VAGGR	GLGSR	ENLR--	LLEELAGV	LGGT	LGA	SRAA	VEAGW
<b>S.f.</b> 204		VSGGR	GMKEAS	NFA--	LVEELAKA	MGA	AVGA	SRAA	VDAGW
<b>S.c.</b> 228		VTGGR	RALKDK	ETFEK-	LLSPLADV	LHAA	IGAT	TRAS	VDNGL
<b>T.t.</b> 215		VSGGR	GVGGPE	GFK--	LIEELAEV	LGGV	GA	SRAA	VEAGW
<b>M.e.</b> 218		VAGGR	GMNSE	EPFKT	GILKEC	ADVL	GGAV	GA	SRAA

		↓	↓↓		↓↓↓		↓↓
<b>A.w.</b>		ACGIS	GAIQH	IAGM	QDS	DI	IIA
<b>H.s.</b> 277		AVGIS	GAIQHL	LAGMK	DSK	TI	VAIN
<b>P.d.</b> 255		AVGIS	GAIQHL	LAGMK	DSK	VI	VAIN
<b>B.f.</b> 287		AIGIS	GAIQH	IAGM	QDS	DI	IIA
<b>C.t.</b> 275		AVGIS	GAIQH	IAGM	QDS	DI	IIA
<b>G.m.</b> 380		ACGIS	GAIQH	LVMQ	SDV	VI	AINR
<b>M.t.</b> 279		AIGIS	GAIQH	LVMQ	NS	EV	IVAIN
<b>S.f.</b> 262		AVGIS	GAIQHL	LAGM	GYS	RY	IVAIN
<b>S.c.</b> 287		AIGV	SGAVQHL	LAGM	DSK	VI	VAIN
<b>T.t.</b> 273		ACGIS	GAIQH	IAGM	GGA	KTI	VAIN
<b>M.e.</b> 278		ACAIS	GAIQPL	AGMT	GS	DC	IIA

B.

**EtfB**

		↓	↓	↓↓↓
<b>A.w.</b>		VDLVLA	GRQA	IDGDTA
<b>H.s.</b> 118		VDLVLL	GKQA	IDDDCN
<b>P.d.</b> 114		TELI	IAGKQA	IDNDMN
<b>B.f.</b> 110		YDLI	IITGRQA	IDGDTA
<b>C.t.</b> 110		YDIV	FAGRQA	IDGDTA
<b>G.m.</b> 115		VGIV	FCCGKQ	ITIDGDTA
<b>M.t.</b> 112		VDLV	FCCGKQA	IDGDTA
<b>S.f.</b> 114		-DII	LIGSRA	VDYDQG
<b>S.c.</b> 120		SNLV	LVMGKQA	IDYDQG
<b>T.t.</b> 111		YDLV	FCCGKQA	IDYDQG
<b>M.e.</b> 117		FDIIL	CGKQA	IDGDTA

Abb. 17. Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von EtfA und EtfB aus *A. woodii* mit verschiedenen pro- und eukaryontischen ETFP's. Mit Hilfe des Programms *Clone Manager Suite 7* wurde ein Vergleich der Untereinheiten durchgeführt. Als Referenz dienten dabei die aus den Teil-Nukleotidsequenzen von *etfA* und *etfB* abgeleiteten Aminosäuresequenzen aus *A. woodii* (A.w.). Gelb markiert sind Aminosäuren, die in *A. woodii* und mindestens 5 der 9 Vergleichssequenzen vorkommen. Basierend auf Strukturdaten von ETFP's von *P. denitrificans* und *H. sapiens* (Roberts *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 1999) wurden Aminosäurereste, die an der Koordinierung der Kofaktoren FAD (A.) und AMP (B.) beteiligt sein könnten, durch Fettdruck hervorgehoben und mit Pfeilen markiert. H.s., *Homo sapiens*; P.d., *P. denitrificans*; B.f., *B. fibrisolvans*; C.t., *C. tetani*; G.m., *G. metallireducens*; M.t., *M. thermoacetica*; S.f., *S. fumaroxidans*; S.c., *S. cerevisiae*; T.t., *T. tencongensis*; M.e., *Megasphaera elsdenii*.

### 3. Die Bildung von NADH im Zuge H<sub>2</sub>-abhängiger Caffeatreduktion

Die hohen spezifischen Aktivitäten der NADH-abhängigen Caffeatreduktion in zellfreien Systemen von *A. woodii* sowie die Identifikation Caffeat-induzierter Elektronen-Transfer-Proteine als potentielle Mediatoren deuten auf eine Rolle von NADH als Elektronendonator *in vivo* hin. Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, wie im Zuge der Reaktionssequenz  $\text{H}_2 + \text{Caffeat} \rightarrow \text{Hydrocaffeat} + \text{NADH}$  gebildet werden könnte und welche Enzyme daran beteiligt sein könnten. Dazu können zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden: eine NAD<sup>+</sup>-reduzierende Hydrogenase oder eine Elektronendonator:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase. Im Folgenden wurden zellfreie Extrakte auf die entsprechenden enzymatischen Aktivitäten überprüft.

#### 3.1 Untersuchungen zur Hydrogenase-Aktivität in *A. woodii*

Aus Fruktose-gezogenen Zellen von *A. woodii* wurde eine Sauerstoff-labile Hydrogenase isoliert (Ragsdale und Ljungdahl, 1984). Das Enzym lag zu über 90% in der löslichen Fraktion vor. Zu ähnlichen Ergebnissen hinsichtlich der Lokalisierung des Enzyms kamen HEISE (Heise, 1992) und DENGL (Dengl, 2004). Dennoch weisen gewaschene Membranen immer noch relativ hohe Hydrogenaseaktivität auf. Dies führte zu der Annahme, dass das Enzym entweder nur schwach mit der Membran assoziiert ist und im Zuge der Präparation abgeschert wird oder dass eine zweite, membranständige Hydrogenase die beobachtete Aktivität katalysiert.

Die Hydrogenase-Aktivität und ihre Lokalisation wurde im Rahmen dieser Arbeit erneut untersucht. Die Messung der Aktivität erfolgte in Quarzküvetten unter einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre. Als Elektronenakzeptoren wurden Benzylviologen oder NAD<sup>+</sup> verwendet. Die Reduktion der Elektronenakzeptoren wurde photometrisch verfolgt. Die Durchführung der Versuche erfolgte bei 30°C.

Mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor konnte in zellfreiem Rohextrakt im dargestellten Fall eine Gesamtaktivität von 25474 U nachgewiesen werden (Tabelle 5). Nach der Auftrennung des Rohextraktes in Cytoplasma- und Membranfraktion gingen rund 85% der Benzylviologen-abhängigen Aktivität verloren. Die Restaktivitäten im Cytoplasma und an Membranen betragen 2708 U und 1058 U, was einer Verteilung von 74% zu 26% entspricht. Die Größenordnungen der spezifischen Aktivitäten der einzelnen Fraktionen entsprachen den

von DENGL (2004) beschrieben. Mit  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor wurde in zellfreiem Rohextrakt eine Gesamtaktivität von 77,8 U nachgewiesen. Die Trennung des Extraktes in Membran- und die cytoplasmatische Fraktion ging mit einem Aktivitätsverlust von rund 85% einher. Die Restaktivität in Cytoplasma und an Membranen betrug 8,7 U und 3 U, was einer Verteilung von 69% zu 31% entspricht.

Obwohl der überwiegende Teil der Hydrogenaseaktivität im Cytoplasma zu finden war, können eindeutige Aussagen bezüglich der Lokalisierung der Hydrogenase letztlich nicht gemacht werden, da der enorme Verlust an Aktivität nach der Auftrennung des Rohextraktes berücksichtigt werden muß. Der Aktivitätsverlust erklärt sich zum Teil mit dem Verlust von Gesamtprotein im Zuge der Herstellung von Cytoplasma- und Membranfraktion (Tabelle 5). Andererseits könnte bei der Herstellung gewaschener Membranen eine Hydrogenase, neben anderen membranständigen und membranassoziierten Proteinen, in den Waschüberstand überführt worden sein. Untersuchungen von DENGL (2004) zur Hydrogenase in *A. woodii* zeigten, dass bis zu 92% der Aktivität in den Membranwaschüberständen zu finden waren. Ein weiterer Grund für die geringe Aktivitätsausbeute ist möglicherweise auf die Inaktivierung der Hydrogenase während der Lagerung der Cytoplasma- und Membranpräparation zurückzuführen. Bei der Präparation zur Untersuchung der  $\text{NAD}^+$ -abhängigen Hydrogenaseaktivität betrug der Verlust an Gesamtprotein rund 44%. Ausgehend vom Rohextrakt entspricht dies einem Aktivitätsverlust von 34,2 U. Von den theoretisch verbleibenden 43,6 U Aktivität (Gesamtaktivität Rohextrakt – 34,2 U) finden sich aber nur 11,7 U in der Cytoplasma- und Membranfraktion wieder.

Insgesamt können die Ergebnisse als Hinweis auf eine  $\text{NAD}^+$ -abhängige Hydrogenase in *A. woodii* betrachtet werden, die  $\text{NADH} + \text{H}^+$  für reduktive Prozesse bereitstellen könnte.

**Tabelle 5. Zelluläre Lokalisation der Hydrogenaseaktivität in *A. woodii*.** Die Messungen der Hydrogenaseaktivität erfolgte in Quarzküvetten einer Schichtdicke von 1 cm unter einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre. Der Reaktionsansatz enthielt 1 ml anaeroben 50 mM Imidazol-Puffer, pH 7,0 und Aliquots der zu testenden Fraktion. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5 mM NAD<sup>+</sup> oder 1 mM Benzylviologen (BV) gestartet. Die Reduktion von Benzylviologen oder NAD<sup>+</sup> wurde in einem Photometer bei 578 nm bzw. 340 nm verfolgt. Gezeigt sind die Daten von zwei unabhängigen Präparationen. Die spezifischen Aktivitäten wurden jeweils aus drei Messungen gemittelt.

Fraktion (GP <sup>1)</sup> )	Akzeptor	Aktivität		Verteilung <sup>2)</sup> (%)	Ausbeute (%)
		(U <sup>3)</sup> /mg)	(Gesamt U)		
Rohextrakt (404)	BV	63	25452		100
Cytoplasma (242)	BV	11,2	2710	72	10,6
Membranen (36)	BV	29,5	1062	28	4,2
Rohextrakt (707)	NAD <sup>+</sup>	0,110	77,8		100
Cytoplasma (348)	NAD <sup>+</sup>	0,025	8,7	69	11,2
Membranen (48)	NAD <sup>+</sup>	0,062	3	31	3,9

<sup>1)</sup>GP, Gesamtproteinkonzentration der Fraktion in mg ; <sup>2)</sup>Die Verteilung bezieht sich auf die Summe der Gesamtaktivitäten in der Cytoplasma- und Membranfraktion; <sup>3)</sup>1 U entspricht einer Rate von 1 µmol Substrat/min

## 3.2 Elektronendonoren:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase

### 3.2.1 Die Verteilung der Aktivität in *A. woodii*

Neben einer Hydrogenase könnte auch eine Elektronendonoren:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase das für die Reduktion von Caffeat notwendige NADH + H<sup>+</sup> generieren. Für das acetogene Bakterium *C. tetanomorphum* wurde beispielsweise ein membranständiges Enzym beschrieben, das *in vivo* als NAD<sup>+</sup>-Reduktase die Bildung von NADH + H<sup>+</sup> katalysiert. Als Elektronendonoren dient dabei reduziertes Ferredoxin (Jayamani *et al.*, 2005). Der Identifikation dieses Enzyms war die Beobachtung vorausgegangen, dass Membranen von *C. tetanomorphum in vitro* die Oxidation von NADH mit Kaliumhexacyanoferrat als

Elektronenakzeptor vermittelten. Es wurde gezeigt, dass diese NADH-Oxidation durch die Ferredoxin-abhängige NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase katalysiert wurde, das Enzym also reversibel ist (Kim *et al.*, 2004). Um erste mögliche Hinweise auf eine membranständige, NADH-generierende Elektronendonator:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase in *A. woodii* zu erhalten, wurde, in Analogie zur reversiblen Ferredoxin-NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase aus *C. tetanomorphum*, mit verschiedenen Elektronenakzeptoren die NADH-oxidierende Aktivität in *A. woodii* und ihre zelluläre Lokalisation untersucht.

Aus Caffeat-induzierten Zellen wurde zellfreier Rohextrakt hergestellt, der anschliessend durch Ultrazentrifugation in Cytoplasma und Membranen aufgetrennt wurde. Die Messung der NADH-oxidierenden Aktivität der einzelnen Fraktionen erfolgte in anaeroben 1-ml-Quarzküvetten unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre in 50 mM Imidazol-Puffer oder 50 mM MOPS-Puffer. Benzylviologen (1 mM) oder Kaliumhexacyanoferrat (1 mM) wurden als Elektronenakzeptor verwendet.

Mit Kaliumhexacyanoferrat als Elektronenakzeptor konnte in zellfreiem Rohextrakt eine Gesamtaktivität von 3824 U nachgewiesen werden (Tabelle 6). Die Auftrennung des Extraktes ging mit einem Aktivitätsverlust von 84% einher. Die Restaktivität in der Cytoplasma- und Membranfraktion betrug 540,5 U und 85,9 U, was einer Verteilung von 86,2% zu 13,8% entspricht. Mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor wurde in zellfreiem Rohextrakt eine Gesamtaktivität von 8556 U nachgewiesen. Nach der Auftrennung des Rohextraktes in Cytoplasma- und Membranfraktion gingen rund 34% der Aktivität verloren. Die Restaktivitäten im Cytoplasma und an Membranen betrugen 5585 U und 74,5 U, was einer Verteilung von 98,7% zu 1,3% entspricht.

Insgesamt kann hinsichtlich der zellulären Verteilung der NADH-oxidierenden Aktivität keine eindeutige Aussage gemacht werden, da, vor allem bei der Messung mit Kaliumhexacyanoferrat, der enorme Aktivitätsverlust berücksichtigt werden muss. Dieser kann zum Teil durch den Verlust an Gesamtprotein im Zuge der Präparation von Cytoplasma- und Membranfraktion erklärt werden (Tabelle 6). Ferner wäre denkbar, dass, in Analogie zur Hydrogenase (siehe 3.1), zudem ein NADH-oxidierendes Enzym beim Waschen der Membranen zusammen mit anderen membranständigen Proteinen in den Waschüberstand überführt wird. Die NADH-oxidierende Aktivität der Waschüberstände wurde allerdings nicht untersucht. Insgesamt betrug der Verlust an Gesamtprotein bei verschiedenen Präparationen stets zwischen 40 – 70%. Die Größenordnung der für gewaschene Membranen ermittelten spezifischen Aktivität der NADH-Oxidation mit der Kaliumhexacyanoferrat als Elektronenakzeptor von 1,7 U liegt in der Größenordnung von der an Membranen von

*C. tetanomorphum* beobachteten (Jayamani *et al.*, 2005). Neben Benzylviologen und Kaliumhexacyanoferrat wurden im Zuge der Untersuchung der membranständigen NADH-oxidierenden Aktivität weitere artifizielle Elektronenakzeptoren getestet. DCIP, FAD, Methylviologen oder Metronidazol wurden nicht reduziert.

Zusammengefasst deuten die Daten klar auf die Gegenwart eines NADH-oxidierenden Enzyms an Membranen von *A. woodii* hin.

**Tabelle 6. Zelluläre Lokalisation der NADH-oxidierenden Aktivität in *A. woodii*.** Gezeigt sind die Ergebnisse von Meßreihen mit zwei verschiedenen Präparationen. **A.** Die Messungen mit Kaliumhexacyanoferrat (KHCF) erfolgte in Quarzküvetten einer Schichtdicke von 0,5 cm unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre. Der Reaktionsansatz enthielt 1 ml 50 mM MOPS-Puffer, pH 7,0, Aliquots der zu testenden Fraktion und KHCF in einer Endkonzentration von 1 mM. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Die Reduktion des KHCF wurde bei 420 nm verfolgt. Alle Messungen wurden bei 30°C durchgeführt. **B.** Die Messungen mit Benzylviologen (BV) als artifiziellm Elektronenakzeptor erfolgte in Quarzküvetten einer Schichtdicke von 1 cm unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre. Der Reaktionsansatz enthielt 1 ml 50 mM Imidazol-Puffer, pH 7,0, Aliquots der zu testenden Fraktion und Benzylviologen in einer Endkonzentration von 1 mM. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM NADH gestartet. Die Reduktion des BV wurde bei 578 nm verfolgt.

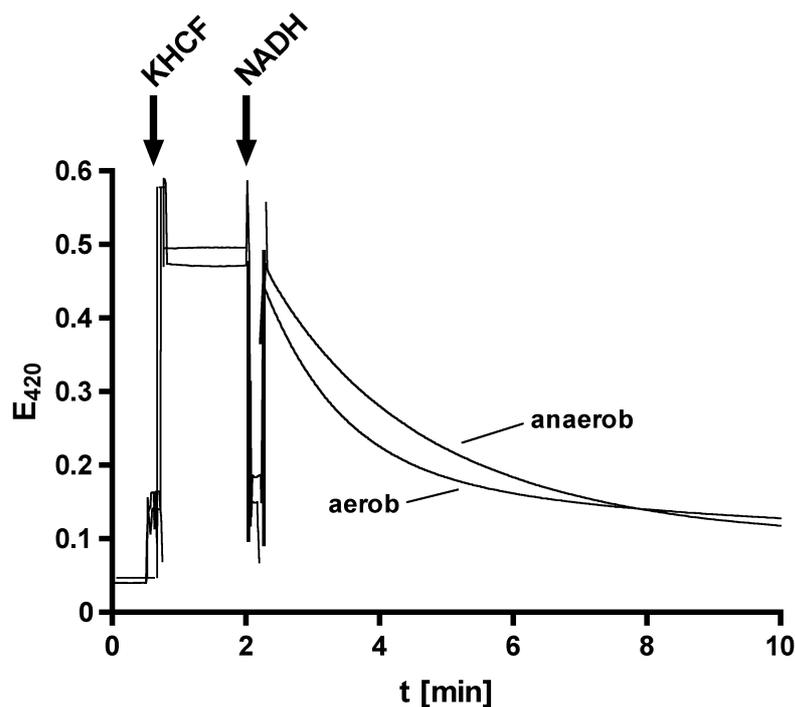
Fraktion (ml/GP <sup>1)</sup> )	Akzeptor	Aktivität		Verteilung <sup>2)</sup> (%)	Ausbeute (%)
		(U <sup>3)</sup> /mg)	(Gesamt U)		
<b>A.</b>					
Rohextrakt (1,36)	KHCF	2,8	3824		100
Cytoplasma (0,36)	KHCF	1,5	540,5	86,2	14,1
Membranen (0,05)	KHCF	1,7	85,9	13,8	2,2
<b>B.</b>					
Rohextrakt (0,63)	BV	13,5	8556		100
Cytoplasma (0,33)	BV	17	5585	98,7	65,3
Membranen (0,033)	BV	2,3	74,5	1,3	0,9

<sup>1)</sup>GP, Gesamtproteinkonzentration der Fraktion in g ; <sup>2)</sup>Die Verteilung bezieht sich auf die Summe der Gesamtaktivitäten in der Cytoplasma- und Membranfraktion; <sup>3)</sup>1 U entspricht einer Rate von 1 µmol Substrat/min

Für das thermophile, acetogene Bakterium *T. tengcongensis* wurde eine Hydrogenase beschrieben, die *in vitro* die NADH-abhängige Reduktion artifizieller Elektronenakzeptoren

wie Methyloviologen vermittelt (Soboh *et al.*, 2004). Im Folgenden sollte daher überprüft werden, ob die beobachtete NADH-Oxidation an Membranen von *A. woodii* durch eine Hydrogenase katalysiert wird. Dazu wurden Aliquots einer Membranpräparation von *A. woodii* 5 min mit Druckluft durchgast. Da Hydrogenasen extrem Sauerstoff-labil sind, führt dies zu einer Inaktivierung des Enzyms. Anschliessend wurden die behandelten Aliquots der Membranfraktion unter aeroben Bedingungen auf NADH-oxidierende Aktivität untersucht. Als Elektronenakzeptor fungierte Kaliumhexacyanoferrat.

Die spezifische Aktivität der mit Sauerstoff behandelten Membranfraktion betrug im dargestellten Fall 1,2 U/mg Protein (Abb. 18). Die Aktivitäten von anaerob präparierten und unter anaeroben Bedingungen gemessenen Membranen waren in der gleichen Größenordnung (1,0 U/mg Protein). Es konnte daher ausgeschlossen werden, dass die beobachtete NADH-Oxidation durch eine membranständige Hydrogenase vermittelt wird. Das Enzym, das die NADH-Oxidation vermittelt, ist also Sauerstoff-stabil.



**Abb. 18. Die membranständige NADH-oxidierende Aktivität ist Sauerstoff-stabil.** Aliquots einer anaeroben Membranpräparation (37 mg Protein/ml) wurden 5 min mit Druckluft durchgast und anschliessend unter aeroben Bedingungen in 50 mM MOPS-Puffer auf NADH-Dehydrogenase-Aktivität untersucht. Als Elektronenakzeptor diente Kaliumhexacyanoferrat (KHCF), das in einer Endkonzentration von 1mM zugegeben wurde. Die Reaktion wurde mit 1 mM NADH gestartet. Als Vergleich diente ein Aliquot der Membranpräparation, dessen Aktivität unter anaeroben Bedingungen untersucht wurde. Die Reduktion des KHCF wurde bei 420 nm in einem Photometer verfolgt.

Analoge Beobachtungen wurden für die Ferredoxin-NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase aus *C. tetanomorphum* gemacht. Die durch das Enzym vermittelte NADH-Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat als Elektronenakzeptor war Sauerstoff-unempfindlich (E. Jayamani, persönliche Mitteilung).

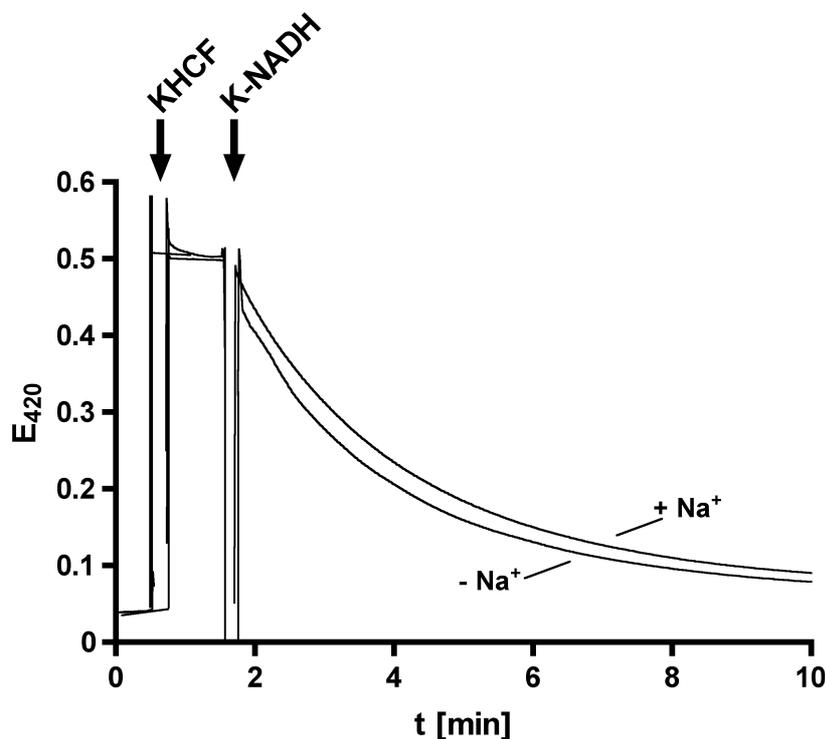
### 3.2.2 Untersuchung der Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit der membranständigen NADH-oxidierenden Aktivität in *A. woodii*

Die N-terminale Sequenzierung der Untereinheiten der Ferredoxin-NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase aus *C. tetanomorphum* ergab hohe Ähnlichkeiten zu den Rnf-Proteinen aus *C. tetani* (Boiangiu *et al.*, 2005; Jayamani *et al.*, 2005). BRÜGGEMANN *et al.* (2003) hatten für die Rnf-Proteine die Funktion eines membranständigen Komplexes postuliert, der die Ferredoxin-abhängige NAD<sup>+</sup>-Reduktion mit der Translokation von Na<sup>+</sup> koppelt. Grundlage dieser Annahme ist die Ähnlichkeit der Rnf-Proteine zu den NADH-Ubichinon-Oxidoreduktasen (Na<sup>+</sup>-NQR) aus *Vibrio alginolyticus* oder *Vibrio cholerae*, die im Zuge der NADH-abhängigen Reduktion von Ubichinon Na<sup>+</sup> translozieren. Für die Ferredoxin-NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase aus *C. tetanomorphum* wird in Analogie dazu die Möglichkeit diskutiert, dass das Enzym den Elektronentransfer von Ferredoxin auf NAD<sup>+</sup> ebenfalls mit der Na<sup>+</sup>-Translokation koppelt. Endgültige experimentelle Belege dafür fehlen allerdings noch. Die begrenzten Sequenzinformationen zur Ferredoxin-NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase lassen gegenwärtig keine Aussage über die Ähnlichkeit des Proteins zu Na<sup>+</sup>-NQR zu. Allerdings konnten in der N-terminalen Sequenz einer Untereinheit des Enzyms konservierte Aminosäuren identifiziert werden, die bei Na<sup>+</sup>-NQR an der Koordinierung eines FMN-Kofaktors beteiligt sind (Boiangiu *et al.*, 2005).

Die Anwesenheit einer membranständigen Elektronendonator:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase in *A. woodii* wäre in zweifacher Hinsicht interessant. Neben der Funktion als Lieferant von Reduktionsäquivalenten für die Caffeatreduktion könnte das Enzym, in Analogie zu Na<sup>+</sup>-NQR, als Na<sup>+</sup>-Translokator fungieren und die Generierung des mit der H<sub>2</sub>-abhängigen Caffeatreduktion einhergehenden transmembranen Na<sup>+</sup>-Potentials bewerkstelligen. Die Aktivität des Enzyms sollte daher strikt Na<sup>+</sup>-abhängig sein. Im Folgenden wurde der Einfluß von Na<sup>+</sup> auf die membranständige NADH-oxidierende Aktivität in *A. woodii* untersucht.

Die Präparation der Membranen aus zellfreien Rohextrakten erfolgte unter möglichst  $\text{Na}^+$ -armen Bedingungen. Vollständig  $\text{Na}^+$ -freie Versuchsbedingungen sind generell schwer zu etablieren, da verwendete Glaswaren, Chemikalien oder Wasser Quellen für  $\text{Na}^+$ -Kontaminationen darstellen. Für alle Arbeitsschritte wurde ein  $\text{Na}^+$ -armer, 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7, verwendet. Die in den Tests verwendeten Lösungen wurden mit destilliertem Wasser angesetzt. Als Elektronendonator wurde das Kaliumsalz von NADH verwendet. Die  $\text{Na}^+$ -Konzentration des Versuchsansatzes betrug nach Zugabe aller Supplemente, einschliesslich des Kalium-NADH, 200  $\mu\text{M}$ .

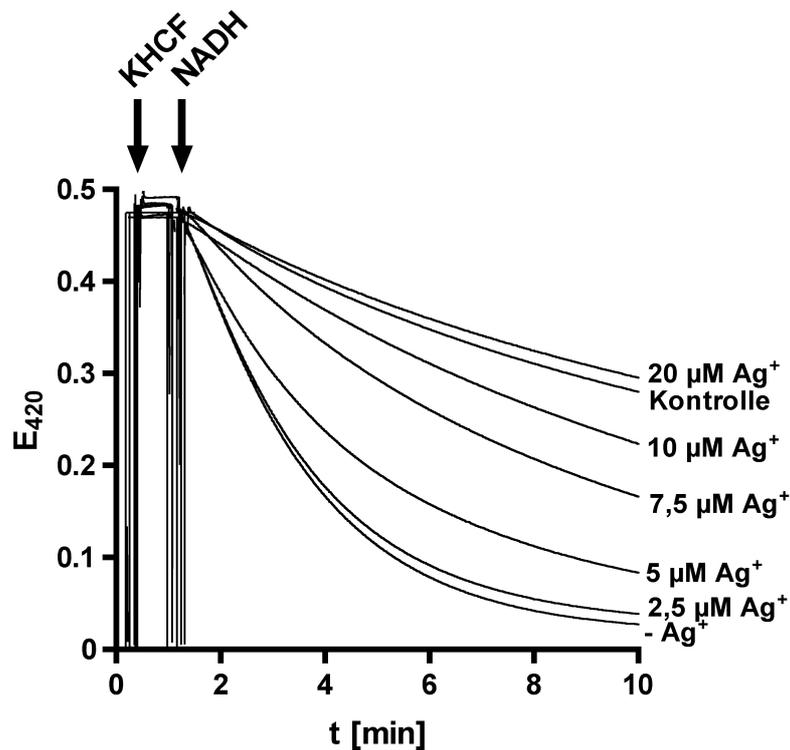
Eine Abhängigkeit der membranständigen NADH-oxidierenden Aktivität von  $\text{Na}^+$  konnte nicht beobachtet werden (Abb. 19). Die ermittelten spezifischen Aktivitäten waren bei 200  $\mu\text{M}$  und 20 mM NaCl nahezu identisch und betrugen im dargestellten Fall 2 U/mg Protein bzw. 1,9 U/mg Protein ( $-\text{Na}^+$ ). Auf die mögliche  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit des membranständigen, NADH-oxidierenden Enzyms wird in der Diskussion (2.2) näher eingegangen.



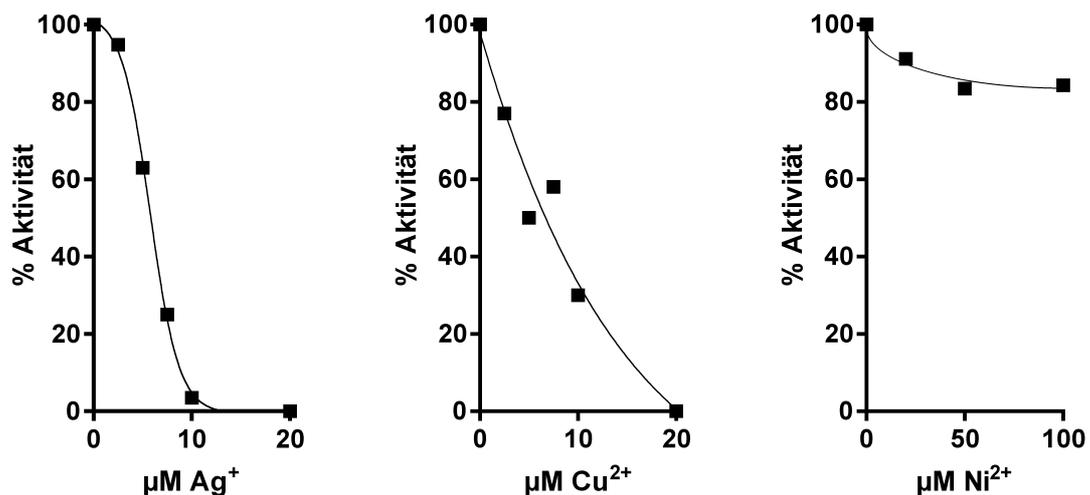
**Abb. 19.** Untersuchung der  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit der membranständigen NADH-oxidierenden Aktivität in *A. woodii*. Aliquots von 2,5  $\mu\text{l}$  einer Membranpräparation (15,7 mg Protein/ml) wurden in Gegenwart von 200  $\mu\text{M}$   $\text{Na}^+$  ohne und mit zugesetztem  $\text{Na}^+$  (20 mM) in anaerobem 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7, auf NADH-Oxidation hin untersucht. Kaliumhexacyanoferrat (KHCF) und K(alium)-NADH wurden in einer Endkonzentration von je 1 mM eingesetzt. Die Reduktion des KHCF wurde in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 420 nm verfolgt.

### 3.2.3 Die Hemmung der membranständigen NADH-oxidierenden Aktivität durch $\text{Ag}^+$

Die Aktivität von  $\text{Na}^+$ -NQR kann spezifisch durch  $\text{Ag}^+$  gehemmet werden (Unemoto *et al.*, 1993). Dieses Charakteristikum unterscheidet sie von mitochondrialen NADH-Dehydrogenasen (Komplex I) und dem zum Komplex I homologen Enzym NDH-I aus Bakterien (Bourne und Rich, 1992). Um Hinweise auf die Natur des membranständigen, NADH-oxidierenden Enzyms in *A. woodii* zu erhalten, wurde der Einfluß von  $\text{Ag}^+$  auf dessen Aktivität untersucht. Aliquots einer Membranpräparation wurden mit steigenden Konzentrationen  $\text{AgNO}_3$  für 10 min vorinkubiert, dann wurde den Ansätzen Kaliumhexacyanoferrat als Elektronenakzeptor zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NADH gestartet. Die initiale NADH-oxidierende Aktivität betrug im dargestellten Fall in Abwesenheit von  $\text{Ag}^+$  1,96 U/mg Protein (Abb. 20). Mit steigenden  $\text{AgNO}_3$ -Konzentrationen nahm die Aktivität kontinuierlich ab. In Gegenwart von 20  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  war sie vollständig inhibiert (vgl. auch Abb. 21). Membranen, die mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{NaNO}_3$  vorinkubiert worden waren, wiesen keine verringerte Aktivität auf. Ein inhibitorischer Effekt durch  $\text{NO}_3^-$  konnte daher ausgeschlossen werden, die Inhibition war also auf  $\text{Ag}^+$  zurückzuführen (Daten nicht gezeigt). Die Aktivität von  $\text{Na}^+$ -NQR kann auch durch  $\text{Cu}^{2+}$  inhibiert werden (Bourne und Rich, 1992). Analoge Beobachtungen wurden für die membranständige NADH-oxidierende Aktivität in *A. woodii* gemacht. In Gegenwart von 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  kam die Aktivität vollständig zum Erliegen. Mit  $\text{Ni}^{2+}$  konnte keine signifikante Inhibition der Aktivität beobachtet werden (Abb. 21). Ob  $\text{Ni}^{2+}$  Einfluß auf die Aktivität von  $\text{Na}^+$ -NQR hat, ist nicht bekannt.

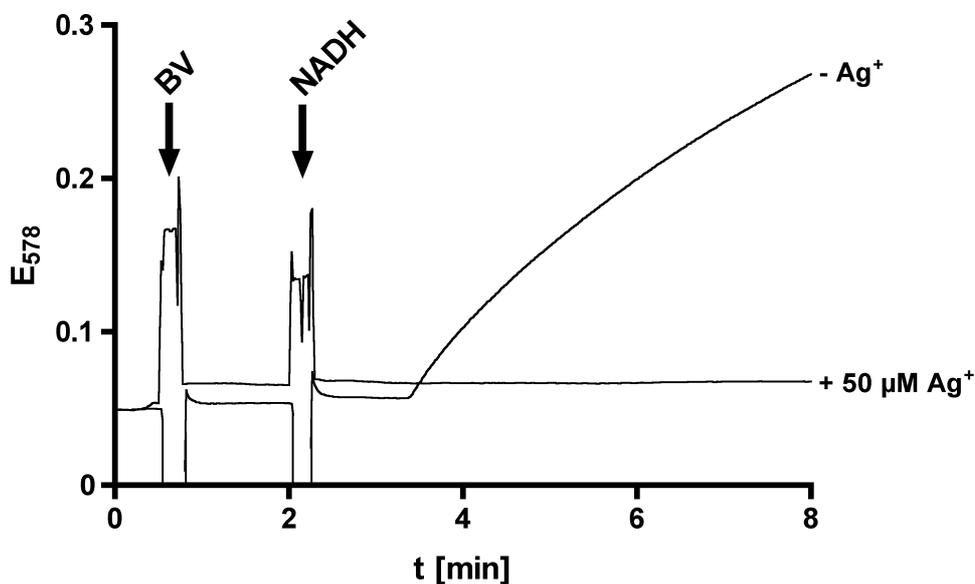


**Abb. 20. Hemmung der membranständigen NADH-oxidierenden Aktivität in *A. woodii* durch  $\text{Ag}^+$ .** Die Versuche wurden bei  $30^\circ\text{C}$  in anaeroben Quarzküvetten durchgeführt, die 1 ml anaeroben 50 mM MOPS-Puffer enthielten. Aliquots ( $5\ \mu\text{l}$ ) einer Membranpräparation ( $9,6\ \text{mg Protein/ml}$ ) wurden für 10 min mit den angegebenen Konzentrationen  $\text{Ag}^+$ , das als  $\text{AgNO}_3$  zugegeben wurde, vorinkubiert. Kaliumhexacyanoferrat (KHCF) und NADH wurden in einer Endkonzentration von je 1 mM zugegeben. Die Reduktion des KHCF wurde in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 420 nm verfolgt. Kontrolle: -  $\text{Ag}^+$ , -Membranen.



**Abb. 21. Inhibition der membranständigen NADH-oxidierenden Aktivität durch Kationen.** Dargestellt sind die Daten einer Meßreihe mit einer Membranpräparation ( $9,6\ \text{mg Protein/ml}$ ). Die Durchführung der Versuche erfolgte wie in Abb. 20 beschrieben. Die spezifischen Aktivitäten wurden aus den Initialraten berechnet und gegen die Basalaktivität der Kontrolle, einem Ansatz ohne Membranen, korrigiert. Die aus den Ansätzen ohne Kationzugabe errechneten Aktivitäten ( $3,9\ \text{U/mg Protein}$  [ $\text{Ag}^+$ ],  $3,3\ \text{U/mg Protein}$  [ $\text{Cu}^{2+}$ ] und  $3,7\ \text{U/mg Protein}$  [ $\text{Ni}^{2+}$ ]) wurde gleich 100% gesetzt.  $\text{Cu}^{2+}$  wurde als  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  als  $\text{NiCl}_2$  zugegeben.

Um einen Einfluß von  $\text{Ag}^+$  auf den verwendeten Elektronenakzeptor Kaliumhexacyanoferrat auszuschliessen, wurde der Versuch mit Benzylviologen als Mediator wiederholt. Auch hier wurde der inhibitorische Effekt von  $\text{Ag}^+$  auf die membranständige NADH-Dehydrogenase-Aktivität beobachtet (Abb. 22). Die Benzylviologen-Reduktion kam im dargestellten Fall in Gegenwart von  $50 \mu\text{M AgNO}_3$  vollständig zum Erliegen. Die im Vergleich zu dem in Abb. 20 dargestellten Versuch deutlich höhere inhibitorische  $\text{Ag}^+$ -Konzentration ist wahrscheinlich auf die höhere Proteinkonzentration der hier verwendeten Membranpräparation zurückzuführen.



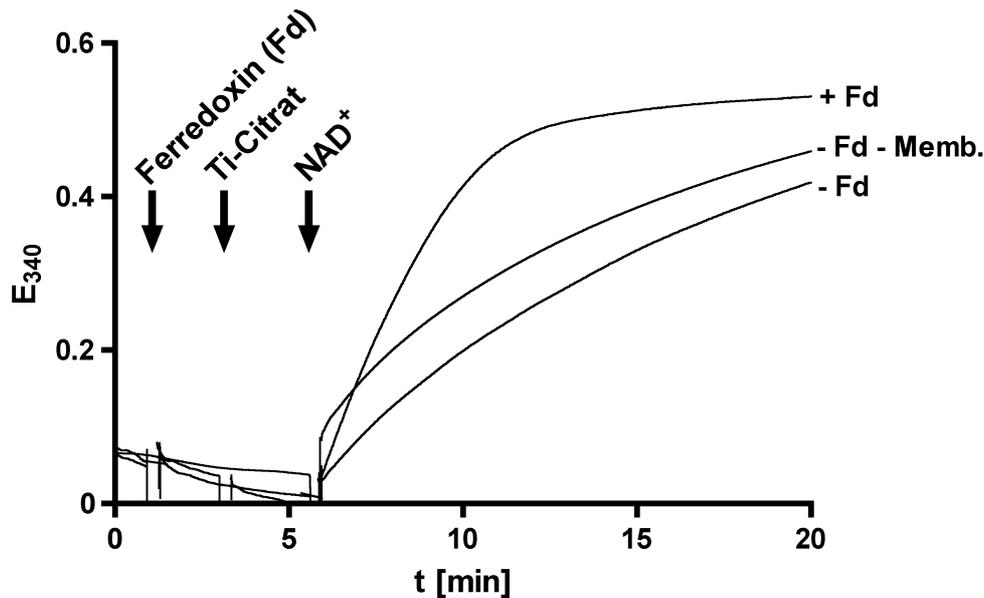
**Abb. 22. Hemmung der NADH-Benzylviologen-Oxidoreduktase durch  $\text{Ag}^+$ .** Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 20 beschrieben. Eingesetzt wurden Aliquots von je  $5 \mu\text{l}$  einer Membranpräparation mit einer Proteinkonzentration von  $37 \text{ mg/ml}$ . Benzylviologen und NADH wurden in einer Endkonzentration von je  $1 \text{ mM}$  zugegeben. Die Reduktion des Benzylviologens wurde in einem Photometer bei einer Wellenlänge von  $578 \text{ nm}$  verfolgt.

### 3.2.4 Untersuchung der membranständigen Ferredoxin- $\text{NAD}^+$ -Oxidoreduktase-Aktivität in *A. woodii*

Die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen weisen klar auf die Anwesenheit eines membranständigen NADH-oxidierenden Enzyms in *A. woodii* hin. Das Enzym vermittelt mit hohen spezifischen Aktivitäten die NADH-abhängige Reduktion artifizierender Akzeptoren. Die Oxidation von NADH muss allerdings nicht der *in vivo*-Reaktionsrichtung entsprechen. Im Folgenden wurde untersucht, ob das Enzym auch als  $\text{NAD}^+$ -Reduktase

fungieren und NADH für die Reduktion von Caffeat generieren könnte. In Hinblick auf die Beteiligung eines solchen Enzyms an der H<sub>2</sub>-abhängigen Caffeatreduktion stellt sich die Frage nach dem Elektronendonator für die Reduktion des NAD<sup>+</sup>. In Analogie zu *C. tetanomorphum* könnte diese Funktion reduziertem Ferredoxin zukommen, das möglicherweise im Zuge der H<sub>2</sub>-Oxidation gebildet wird. Für eine aus *A. woodii* isolierte Hydrogenase wurde die Fähigkeit beschrieben, Ferredoxin als Elektronenakzeptor zu nutzen (Ragsdale und Ljungdahl, 1984). Gewaschene Membranen wurden auf Ferredoxin-NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase-Aktivität überprüft. Der dafür verwendete Test basiert im Wesentlichen auf einem von JAYAMANI *et al.* (2005) etablierten Testsystem zur Untersuchung dieser Aktivität in *C. tetanomorphum*. Aliquots einer Membranpräparation von *A. woodii* wurden zusammen mit Ferredoxin inkubiert, welches durch Ti-(III)-Citrat vorreduziert wurde. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von NAD<sup>+</sup> gestartet, dessen Reduktion photometrisch verfolgt wurde.

An gewaschenen Membranen von *A. woodii* konnte eine Ferredoxin-abhängige NAD<sup>+</sup>-Reduktion beobachtet werden (Abb. 23). Im dargestellten Fall betrug die spezifische Aktivität 91 nmol/min x mg Protein. Ungewöhnlich war die hohe Rate in den Kontrollansätzen. In Abwesenheit von Ferredoxin oder Membranen betrug sie 39 nmol/min x mg Protein. In diesen Ansätzen wurde NAD<sup>+</sup> chemisch durch Ti-(III)-Citrat reduziert. Eine schrittweise Verringerung der Ti-(III)-Konzentration führte zwar zu einer Abnahme der chemischen Reduktion von NAD<sup>+</sup>, eine Ferredoxin-abhängige Reduktion konnte dann allerdings auch nicht mehr beobachtet werden. Möglicherweise begünstigte der pH-Wert des verwendeten Puffers die chemische NAD<sup>+</sup>-Reduktion. In den von JAYAMANI *et al.* beschriebenen Untersuchungen zur Ferredoxin-NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase in *C. tetanomorphum* war eine durch Ti-(III)-Citrat bedingte chemische Reduktion von NAD<sup>+</sup> allerdings erst bei pH-Werten über 8 zu beobachten (Jayamani *et al.*, 2005).

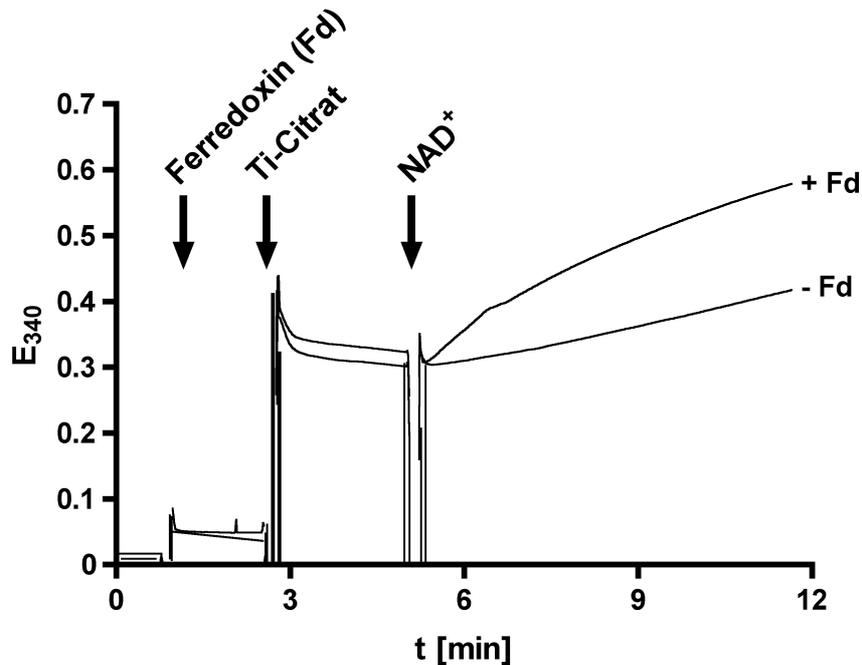


**Abb. 23. Ferredoxin-NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase-Aktivität an Membranen von *A. woodii*.** Die Durchführung des Versuchs erfolgte bei 30°C in anaeroben 1-ml-Quarzküvetten, die 1 ml 50 mM MOPS, pH 7,5 enthielten. Ein Aliquot von 25 µl einer Membranpräparation (27,4 mg Protein/ml) wurde mit 50 µl einer Ferredoxin-Lösung (2 mg Protein/ml) supplementiert. Das zugegebene Ferredoxin wurde mit 3,5 mM Ti-(III)-Citrat vorreduziert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2,5 mM NAD<sup>+</sup> gestartet. Als Kontrollen dienten Ansätze, denen kein Ferredoxin (- Fd) oder kein Ferredoxin und keine Membranen zugegeben wurden (- Fd - Memb.). Die Reduktion des NAD<sup>+</sup> wurde in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt. Das verwendete Ferredoxin stammte aus *C. tetanomorphum* und wurde freundlicherweise von E. Jayamani, Marburg zur Verfügung gestellt.

Rund 43% der beobachteten Ferredoxin-abhängigen NAD<sup>+</sup>-Reduktion sind also nicht physiologischer Natur. Der dennoch deutliche Unterschied der NAD<sup>+</sup>-Reduktionsaktivität in Gegenwart von Ferredoxin kann als Hinweis auf eine membranständige Ferredoxin-NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase betrachtet werden.

Um eine Verringerung des Anteils chemischer NAD<sup>+</sup>-Reduktion an der Gesamtaktivität zu erreichen, wurde der Versuch bei pH 7,0 wiederholt. Dabei wurde eine heterogene Ferredoxin-Präparation aus *C. pasteurianum* verwendet, deren Reinheitsgrad deutlich unter dem der Präparation aus *C. tetanomorphum* lag. Auffällig war bei diesem Versuch der Anstieg der Absorption um rund 0,35 Einheiten nach Zugabe von Ti-(III)-Citrat. Ursache hierfür war offensichtlich die durch das Ti-(III)-Citrat bedingte leichte Blaufärbung des Versuchspuffers. Warum im oben beschriebenen Versuch diese Absorptionzunahme nicht beobachtet werden konnte, ist unklar und wurde nicht weiter untersucht. Die spezifische NAD<sup>+</sup>-Reduktionsaktivität betrug im dargestellten Fall in Gegenwart von Ferredoxin 37,5 nmol/min x mg Protein und fiel damit deutlich geringer aus als in dem zuvor beschriebenen Versuch (Abb. 24). Dies könnte auf den geringeren Ferredoxin-Gehalt der Präparation aus *C. pasteurianum* und deren Heterogenität sowie die Qualität der unterschiedlichen

Membranpräparation zurückzuführen sein. Insgesamt konnte bei pH 7 ein Rückgang der Basalaktivität im Kontrollansatz beobachtet werden (19 nmol/min x mg Protein). Im Verhältnis zur Aktivität des Ferredoxin-supplementierten Ansatzes aber war der Anteil Ti-(III)-Citrat reduzierten  $\text{NAD}^+$ s mit 47% in der Größenordnung des zuvor beschriebenen Versuches.



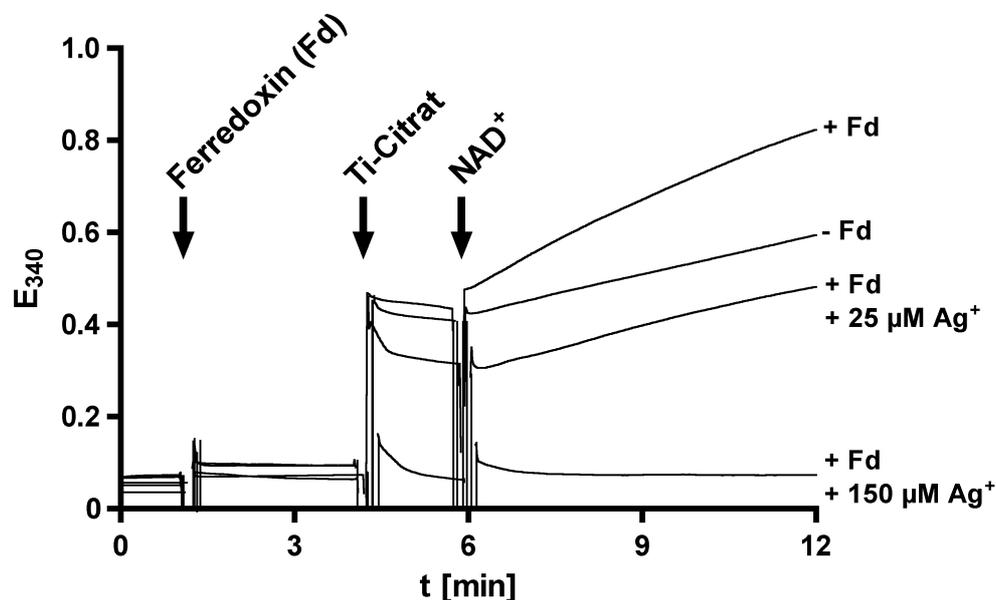
**Abb. 24. Ferredoxin- $\text{NAD}^+$ -Oxidoreduktase-Aktivität an Membranen von *A. woodii* bei pH 7,0.** Die Durchführung des Versuchs erfolgte bei 30°C in anaeroben 1-ml-Quarzküvetten, die 1 ml 50 mM MOPS, pH 7,0 enthielten. Aliquots von 25  $\mu\text{l}$  einer Membranpräparation (24,9 mg Protein/ml) wurden mit 30  $\mu\text{l}$  einer Ferredoxin-Präparation aus *C. pasteurianum* (4 mg Protein/ml) supplementiert. Ti-(III)-Citrat wurde in einer Endkonzentration von 3,5 mM zugegeben. Die Reaktion wurde mit 2,5 mM  $\text{NAD}^+$  gestartet. Die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt.

### 3.2.5 Der Einfluß von $\text{Ag}^+$ auf die Ferredoxin- $\text{NAD}^+$ -Oxidoreduktase-Aktivität

Wie in den vorangegangenen Untersuchungen gezeigt wurde, katalysieren gewaschene Membranen von *A. woodii* die Oxidation von NADH mit Kaliumhexacyanoferrat oder Benzylviologen als Elektronenakzeptor. Ferner wurde eine membranständige Ferredoxin- $\text{NAD}^+$ -Oxidoreduktaseaktivität nachgewiesen. Ob die NADH-Oxidation und die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion durch das gleiche, reversible Enzym katalysiert werden ist unklar. Die unter 3.2.3 beschriebenen Versuche hatten gezeigt, dass die membranständige NADH-oxidierende Aktivität durch  $\text{Ag}^+$  gehemmt werden konnte. Nachfolgend wurde daher auch der Einfluß von

$\text{Ag}^+$  auf die Ferredoxin-abhängige  $\text{NAD}^+$ -Reduktion an Membranen untersucht. Die Versuche wurden wie unter 6.2.4 beschrieben durchgeführt.

Die Analyse zeigte, dass  $\text{AgNO}_3$  die Ferredoxin- $\text{NAD}^+$ -Oxidoreduktase-Aktivität vollständig hemmt (Abb. 25). In Abwesenheit von  $\text{Ag}^+$  betrug die Rate der Ferredoxin-abhängigen  $\text{NAD}^+$ -Reduktion  $38,8 \text{ nmol/min} \times \text{mg Protein}$ . In Gegenwart von  $25 \mu\text{M AgNO}_3$  entsprach die Aktivität in etwa der Basalaktivität des Kontrollansatzes ohne Ferredoxin ( $21,5 \text{ nmol/min} \times \text{mg Protein}$ ). Bemerkenswert waren allerdings zwei Beobachtungen. Die Zugabe von Ti-(III)-Citrat führte, wie bereits für Abb. 24 beschrieben, zu einem Anstieg der Absorption um etwa 0,45 Einheiten. In Gegenwart von  $\text{AgNO}_3$  fiel dieser Anstieg geringer aus, und zwar umso stärker je höher die  $\text{AgNO}_3$ -Konzentration im Versuchsansatz war. Zudem kam bei höheren  $\text{AgNO}_3$ -Konzentrationen ( $150 \mu\text{M}$ ) auch die Basalaktivität, d.h. die chemische Reduktion des  $\text{NAD}^+$  durch Ti-(III)-Citrat, vollständig zum Erliegen. Zusammengenommen weisen beide Beobachtungen auf einen Einfluß von  $\text{AgNO}_3$  auf Ti-(III)-Citrat hin, so dass die hier beobachtete Inhibition der Ferredoxin-Oxidoreduktase-Aktivität wahrscheinlich indirekter Natur ist. Ferner kann ein Effekt des  $\text{AgNO}_3$  auf das Ferredoxin nicht ausgeschlossen werden.



**Abb. 25.** Der Einfluß von  $\text{Ag}^+$  auf die membranständige Ferredoxin- $\text{NAD}^+$ -Oxidoreduktase-Aktivität in *A. woodii*. Die Durchführung des Versuchs erfolgte bei  $30^\circ\text{C}$  in anaeroben 1-ml-Quarzküvetten, die 1 ml 50 mM MOPS-Puffer, pH 7,0 enthielten. Die Küvetten wurden mit 25- $\mu\text{l}$ -Aliquots einer Membranpräparation (35 mg Protein/ml) supplementiert und gegebenenfalls für 10 min mit  $\text{AgNO}_3$  in den angegebenen Endkonzentrationen inkubiert. Das zugegebene Ferredoxin aus *C. pasteurianum* (30  $\mu\text{l}$ ; 1,9 mg Protein/ml) wurde mit 3,5 mM Ti-(III)-Citrat vorreduziert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2,5 mM  $\text{NAD}^+$  gestartet. Die Reduktion des  $\text{NAD}^+$  wurde in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt.

## 4. Induktion und Spezifität des Phenylacrylat-Reduktionssystems in *A. woodii*

### 4.1 Nachweis eines universellen Phenylacrylat-Reduktionssystems

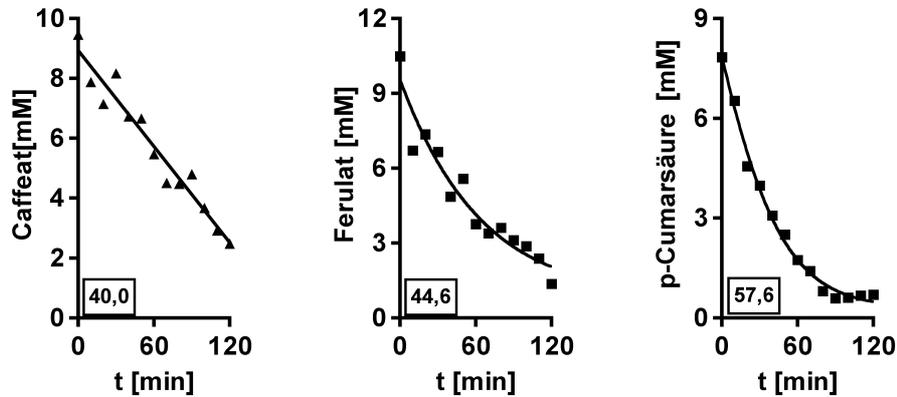
Neben Caffeat kann *A. woodii* eine Vielzahl anderer Phenylacrylate als terminale Elektronenakzeptoren nutzen (Bache und Pfennig, 1981). Diese Fähigkeit liegt nicht konstitutiv vor, sondern wird erst in Gegenwart dieser Verbindungen induziert. Über die Induktionsmechanismen und die Spezifität der induzierten Enzyme ist nichts bekannt. Zwei Möglichkeiten können dazu in Betracht gezogen werden:

- *A. woodii* verfügt für jedes einzelne Phenylacrylat über ein spezifisches Reduktionssystem, das nur in Gegenwart des Phenylacrylats induziert wird oder
- die Reduktion wird durch unspezifische Enzyme vermittelt, die mehrere Phenylacrylate umsetzen können.

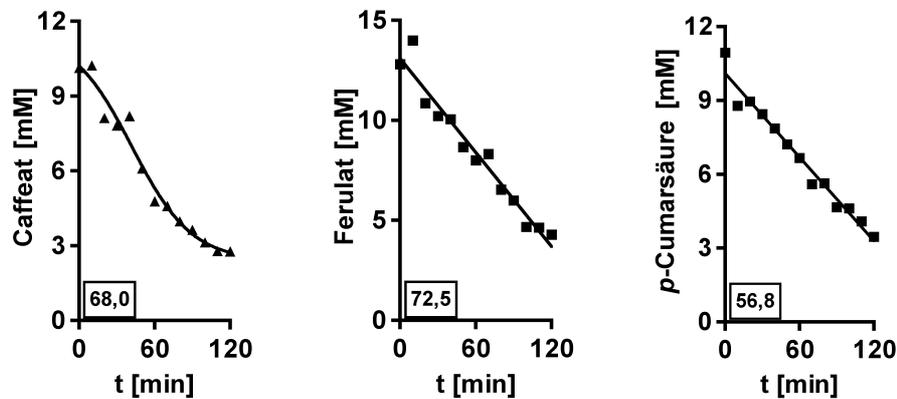
Diese Fragestellung wurde im Folgenden zunächst an Suspensionen ruhender Zellen von *A. woodii* untersucht, die aus Kulturen Caffeat-induzierter Zellen hergestellt worden waren. Die Zellsuspensionen wurden unter einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert und mit den Phenylacrylaten Caffeat, Ferulat oder *p*-Cumarsäure in einer Endkonzentration von 10 mM supplementiert.

Wie aus Abb. 26 A ersichtlich, reduzierten Suspensionen Caffeat-induzierter Zellen nicht nur Caffeat, sondern waren auch in der Lage, Ferulat oder *p*-Cumarsäure mit H<sub>2</sub> als Elektronendonator zu reduzieren. In Analogie dazu waren Ferulat- oder *p*-Cumarsäure-induzierte Zellsuspensionen in der Lage, Caffeat oder *p*-Cumarsäure bzw. Caffeat oder Ferulat mit H<sub>2</sub> als Elektronendonator zu reduzieren (Abb. 26 B und C). Die Daten dieser Untersuchung legen nahe, dass in *A. woodii* die Reduktion von Phenylacrylaten durch ein induzierbares, universell-fungierendes Reduktions-System bewerkstelligt wird.

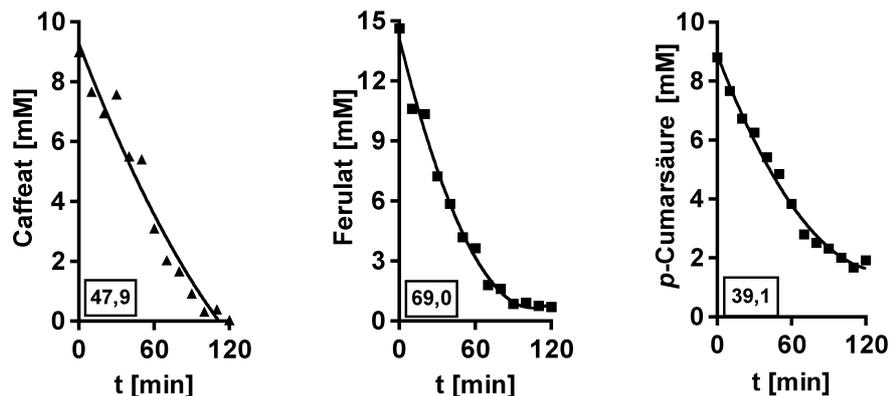
A.



B.



C.



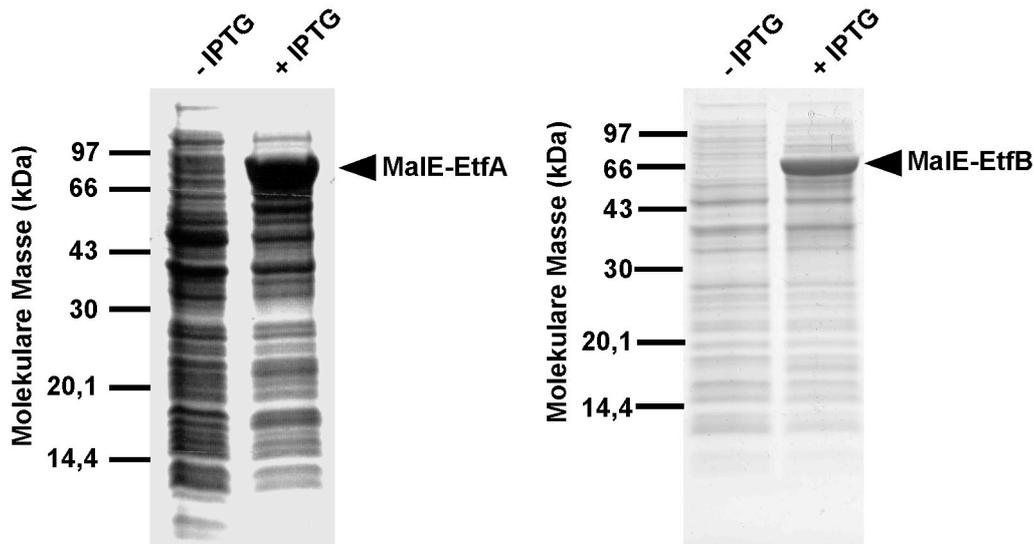
**Abb. 26. H<sub>2</sub>-abhängige Reduktion verschiedener Phenylacrylate durch A. Caffeate-induzierte, B. Ferulat-induzierte und C. p-Cumarsäure-induzierte Suspensionen ruhender Zellen von *A. woodii*.** Die Zellsuspensionen (A. 1,35 mg Protein/ml; B. 1,0 mg Protein/ml; C. 1,89 mg Protein/ml) wurden in einem Schüttelwasserbad bei 30°C in Gegenwart von 10 mM NaCl 10 min inkubiert. Zum Zeitpunkt t = 0 min erfolgte die Zugabe des jeweiligen Phenylacrylats in einer Endkonzentration von 10 mM. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, deren Phenylacrylatkonzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 312 nm (Caffeate, Ferulat) und 286 nm (p-Cumarsäure) bestimmt wurde. Die eingerahmten Zahlen geben die spezifische Reduktionsrate in nmol Phenylacrylat/min x mg Protein wieder.

## 4.2 Immunologischer Nachweis der Induktion von EtfA und EtfB

### 4.2.1 Herstellung spezifischer Antiseren gegen EtfA und EtfB aus *A. woodii*

Für die Analyse der Induktion von EtfA und EtfB wurden spezifische polyklonale Antiseren generiert. Dazu wurden die Proteine aus *A. woodii* als heterologe Fusionsproteine in *E. coli* DH5a überproduziert. Dabei kam das MalE-System von *New England Biolabs* zur Anwendung. Das Gen, welches für das zu produzierende Protein kodiert, wird hierbei am 5'-Ende mit dem für das Maltose-Bindeprotein kodierenden *malE*-Gen aus *E. coli* fusioniert. Dies ermöglicht die Überproduktion großer Mengen des gewünschten Proteins in löslicher Form. Ferner kann der MalE-tag zur Aufreinigung des Fusionsproteins genutzt werden.

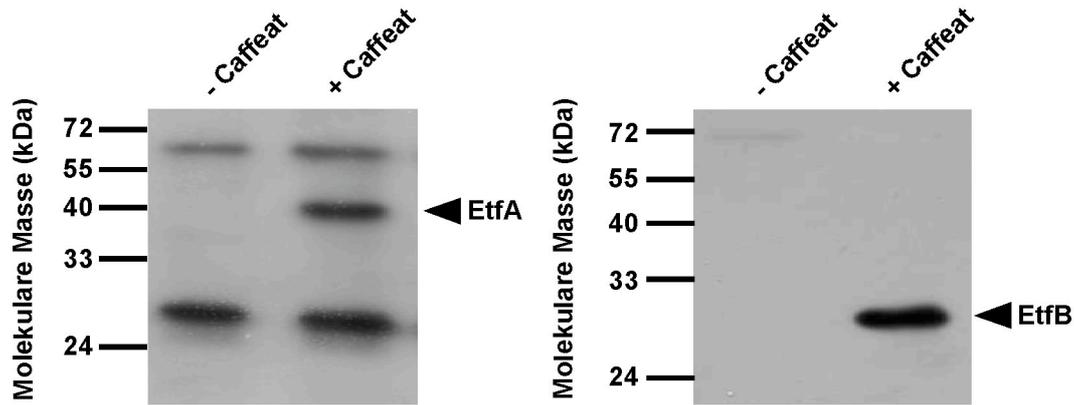
Unter Verwendung der spezifischen Oligonukleotide EtfA\_forward *Bam*HI und EtfA\_reverse *Sal*I wurden in das Genfragment *etfA* mittels PCR Restriktionsschnittstellen inseriert. Als Matrize diente das Plasmid TOPO-*etfA*. Das erhaltene PCR-Produkt einer Größe von 900 Bp wurde gereinigt, restringiert und in das Plasmid pMal-C2 kloniert. Basierend auf der zur Verfügung stehenden Sequenzinformation des *etfB/etfA*-Fragments wurden die spezifischen Oligonukleotide EtfB\_forward *Eco*RI und EtfB\_reverse *Pst*I abgeleitet, mit deren Hilfe ein 504 Bp-großes *etfB*-Fragments aus TOPO-*etfBA* amplifiziert und mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen versehen wurde. Das PCR-Produkt wurde gereinigt, restringiert und in das Plasmid pMal-C2 kloniert. *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde mit den Plasmiden pMal-*etfA* und pMal-*etfB* transformiert. Die heterologe Überproduktion von MalE-EtfA bzw. MalE-EtfB erfolgte in 500-ml-Kulturen und wurde durch die Zugabe von IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 induziert. Die produzierten Proteine wiesen molekulare Massen der erwarteten Größenordnung auf (MalE-EtfA: 75 kDa; MalE-EtfB: 60 kDa; Abb. 27). Die überproduzierten MalE-Fusionsproteine wurden anschliessend mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Gereinigte Fraktionen der heterologen Proteine wurden für die Immunisierung von Kaninchen zur Generierung von Antiseren gegen EtfA und EtfB herangezogen.



**Abb. 27. Heterologe Produktion von EtfA und EtfB aus *A. woodii* als MalE-Fusionsproteine in *E. coli*.** *E. coli* DH5 $\alpha$ , der mit den Plasmiden pMal-*etfA* oder pMal-*etfB* transformiert worden war, wurde in 500 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium angezogen. Die Produktion der Fusionsproteine MalE-EtfA und MalE-EtfB wurde durch Zugabe von 0,3 mM IPTG induziert. Dargestellt sind Coomassie-gefärbte 12%ige Polyacrylamidgele, in denen Proben aus Kulturen vor der IPTG-Zugabe (- IPTG) und drei Stunden nach der Induktion der Überproduktion (+ IPTG) aufgetrennt wurden.

Nach der finalen Blutentnahme aus den immunisierten Kaninchen wurden die gewonnenen Antisera auf ihre Spezifität getestet. Dazu wurden 50-ml-Kulturen von *A. woodii* mit Fruktose in Gegenwart oder in Abwesenheit von 10 mM Caffeate angezogen. Nach Erreichen der spätexponentiellen Wachstumsphase erfolgte die Ernte der Zellen. Zu diesem Zeitpunkt waren 90 – 95% des zugegebenen Caffeats reduziert.

Trotz einiger unspezifischer Bindungen konnten mit den Antisera Proteine einer molekularen Masse von rund 45 kDa (EtfA) und 30 kDa (EtfB) detektiert werden, die nur in Gegenwart von Caffeate nachzuweisen waren (Abb. 28). Die in der Immunoblot-Analyse detektierten Proteine entsprachen in ihrer molekularen Masse den mittels 2D-Gelelektrophorese identifizierten Caffeate-induzierten Proteinen.



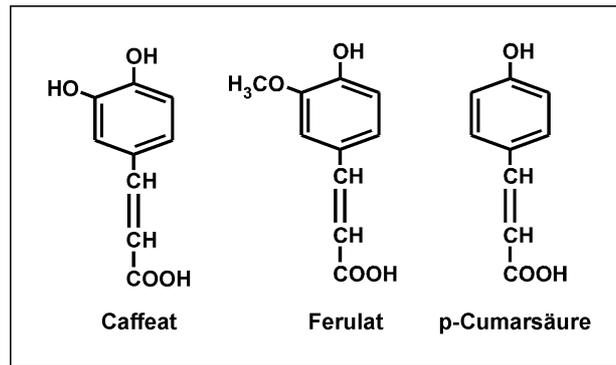
**Abb. 28. Untersuchung der Spezifität der Antiseren gegen EtfA und EtfB.** 50-ml-Kulturen von *A. woodii* wurden mit 20 mM Fruktose in Gegenwart (+ Caffeat) oder in Abwesenheit von Caffeat (- Caffeat) angezogen. Zelllysate wurden mittels 12%iger SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Die anschließende immunologische Untersuchung der Proben erfolgte mit den Antiseren gegen EtfA und EtfB.

#### 4.2.2 Analyse der Induktion von EtfA und EtfB durch Phenylacrylate und strukturell ähnliche Verbindungen

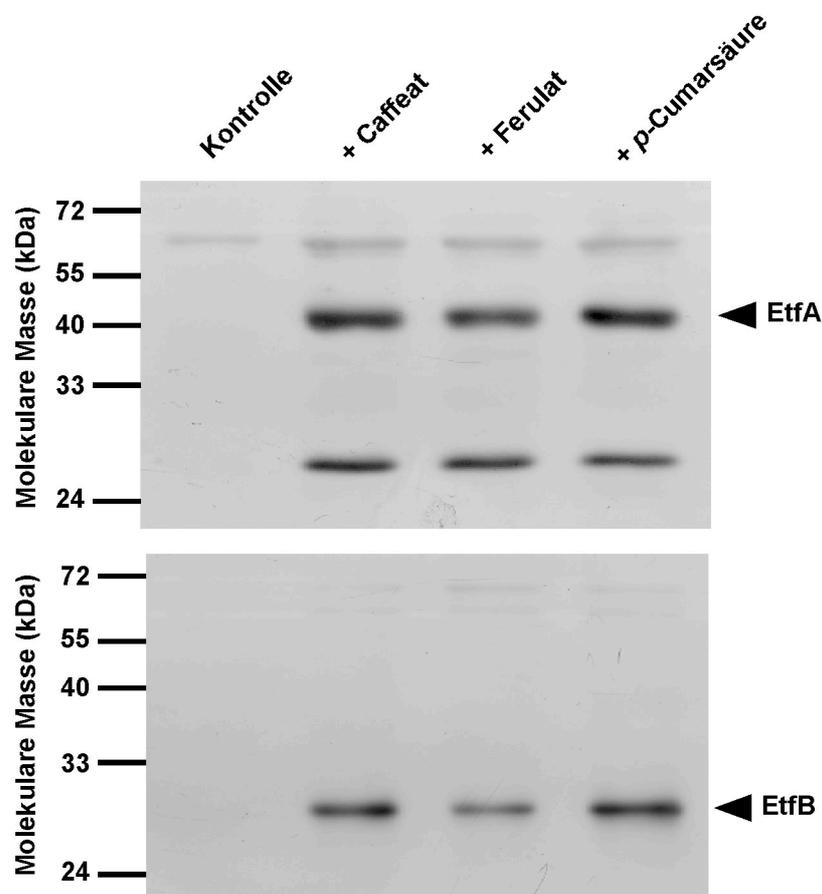
Wie unter 4.1 gezeigt, erfolgt in *A. woodii* die Reduktion von Phenylacrylaten offensichtlich mit Hilfe eines einzigen enzymatischen Systems, das in Gegenwart dieser Verbindungen induziert wird. Die Caffeat-induzierten Proteine EtfA und EtfB könnten Teil eines solchen Systems sein. Das von ihnen gebildete Elektronentransfer-Flavoprotein spielt daher möglicherweise nicht nur bei der Caffeatreduktion eine Rolle, sondern könnte als universeller Mediator der Phenylacrylat-Reduktion fungieren. Ein Indiz dafür wäre die Induktion von EtfA und EtfB in Gegenwart verschiedener Phenylacrylate.

Zur Klärung dieser Frage wurde *A. woodii* mit 20 mM Fruktose in Gegenwart von 10 mM Caffeat, Ferulat oder *p*-Cumarsäure (Abb. 29 A) angezogen. Nach Erreichen der spätexponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellen geerntet und wie unter 4.2.1 beschrieben aufgearbeitet. Die Induktion von EtfA und EtfB wurde mittels Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antiseren untersucht. Wie in Abb. 29 B ersichtlich, wurden die Proteine nicht nur durch Caffeat, sondern auch in Gegenwart der Phenylacrylate Ferulat oder *p*-Cumarsäure induziert.

A.



B.



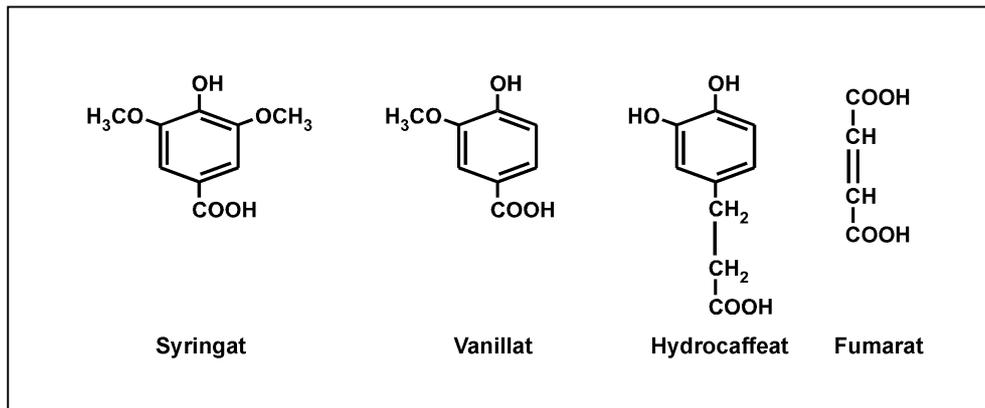
**Abb. 29. A. Struktur der Phenylacrylate Caffeat, Ferulat und *p*-Cumarsäure. B. EtfA und EtfB werden durch verschiedene Phenylacrylate induziert.** *A. woodii* wurde mit 20 mM Fruktose in Gegenwart von 10 mM Caffeat, Ferulat oder *p*-Cumarsäure oder in Abwesenheit eines Phenylacrylats (Kontrolle) angezogen. Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Die anschließende immunologische Untersuchung der Proben erfolgte mit den Antiseren gegen EtfA und EtfB.

Nachfolgend wurde untersucht, ob in Gegenwart von Verbindungen mit zu Phenylacrylaten strukturellen Ähnlichkeiten wie Syringat, Vanillat, Hydrocaffeate oder Fumarat (Abb. 30 A; vgl. hierzu auch Abb. 4 der Einleitung) die Produktion von EtfA und EtfB induziert wird. Wie

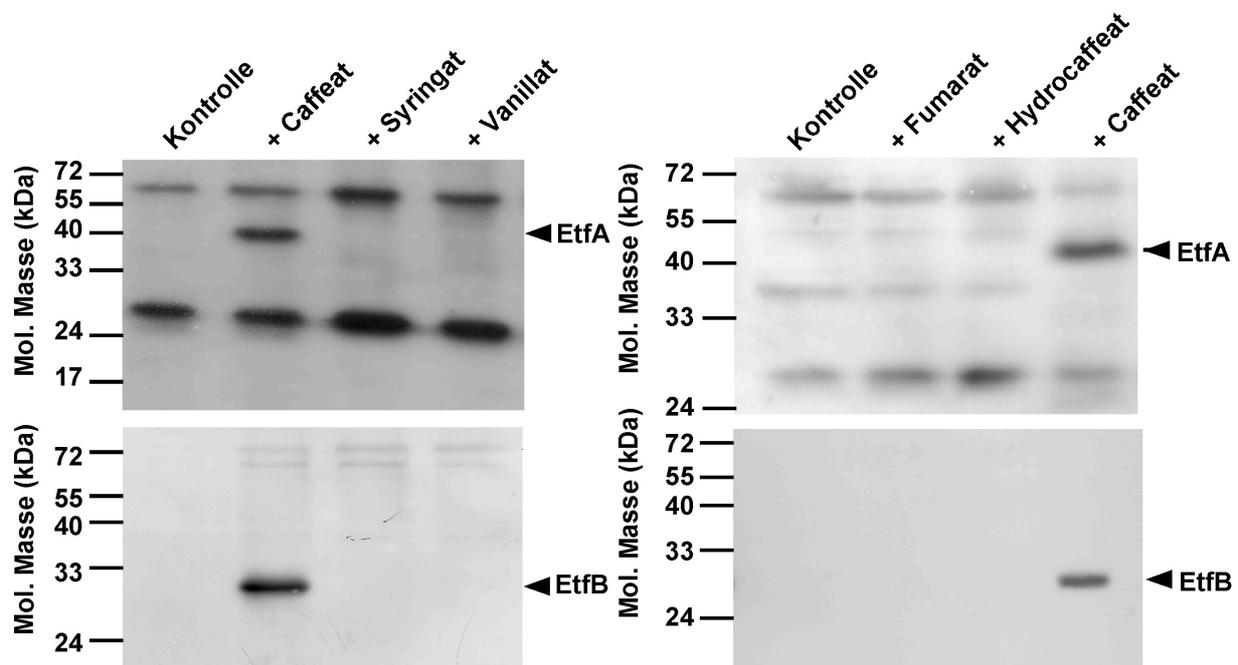
in Abb. 30 B ersichtlich, erfolgte in Gegenwart dieser Verbindungen keine Induktion von EtfA und EtfB. Dagegen hatten Zellen, die in Anwesenheit des Phenylacrylats Caffeat gewachsen waren, die beiden Proteine produziert.

Zusammengefasst deuten diese Versuche auf eine Funktion für EtfA und EtfB hin, die ausschliesslich mit der Reduktion von Phenylacrylaten zusammenhängt und legen eine Beteiligung der Proteine am Phenylacrylat-induzierten Reduktionsapparat von *A. woodii* nahe.

A.



B.

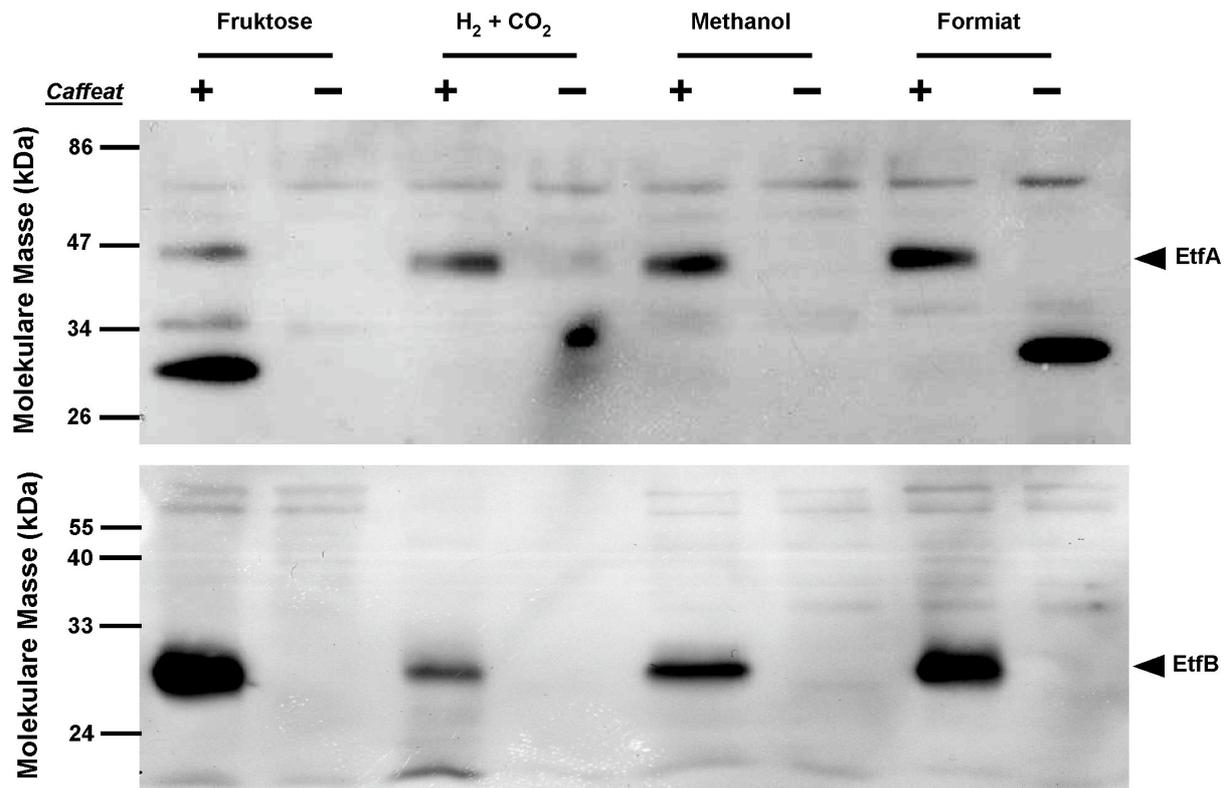


**Abb. 30. A. Verbindungen mit strukturellen Ähnlichkeiten zu Phenylacrylaten. B. Die Induktion von EtfA und EtfB erfolgt ausschliesslich durch Phenylacrylate.** *A. woodii* wurde mit 20 mM Fruktose in Gegenwart von 10 mM einer der oben angegebenen Verbindungen angezogen. Die Kontrollkultur enthielt nur Fruktose. Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Die anschliessende immunologische Untersuchung der Proben erfolgte mit den Antiseren gegen EtfA und EtfB.

### 4.2.3 Die Induktion von EtfA und EtfB durch Caffeat bei Wachstum auf verschiedenen Substraten

In *A. woodii* kann die Reduktion von Phenylacrylaten sowohl bei chemoorganoheterotrophem als auch bei chemolithoautotrophem Wachstum beobachtet werden (Bache und Pfennig, 1981; Tschech und Pfennig, 1984; Hansen *et al.*, 1988). Dies lässt den Schluß zu, dass die bei der Substratoxidation freiwerdenden Elektronen auf ein zentrales *input*-Modul übertragen werden, welches diese direkt oder indirekt an eine terminale „Phenylacrylat-Reduktase“ weiterleitet. Diese Kanalisierung der Elektronen wird möglicherweise durch ein aus EtfA und EtfB bestehendes ETFP vermittelt. Die Induktion von EtfA und EtfB bei Wachstum auf verschiedenen Substraten wurde deshalb im Folgenden untersucht. *A. woodii* wurde in 50-ml-Kulturen in Gegenwart von 10 mM Caffeat mit Fruktose, Formiat, Methanol oder  $H_2 + CO_2$  angezogen. Die Zellen wurden nach Erreichen der spätexponentiellen Wachstumsphase geerntet und wie unter 6.1 beschrieben für die Western-Blot-Analyse aufgearbeitet.

Sowohl unter chemoorganoheterotrophen als auch chemolithoautotrophen Wachstumsbedingungen erfolgt in Gegenwart von Caffeat die Induktion von EtfA und EtfB. Zusammen mit der beobachteten Induktion durch verschiedene Phenylacrylate kann dies als weiterer Hinweis auf die zentrale Rolle des EtfA/EtfB-Proteins als Elektronenmediator bei der Reduktion von Phenylacrylaten interpretiert werden.



**Abb. 31. Die Induktion von EtfA und EtfB durch Caffeat bei Wachstum auf verschiedenen Substraten.** *A. woodii* wurde in Gegenwart von 10 mM Caffeat mit 20 mM Fruktose, 60 mM Methanol, 200 mM Formiat oder H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub> angezogen. Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Die anschließende immunologische Untersuchung der Proben erfolgte mit den Antiseren gegen EtfA und EtfB.

## Diskussion

### 1. Die Nutzung alternativer terminaler Elektronenakzeptoren bei acetogenen Bakterien - Die Regulation des Elektronenflusses

Bei acetogenen Bakterien werden im Wood-Ljungdahl-Weg die im Stoffwechsel anfallenden Elektronen auf den terminalen Akzeptor  $\text{CO}_2$  übertragen, der sukzessive zu Acetat reduziert wird. Untersuchungen der letzten Jahre zeigten allerdings, dass unter bestimmten Bedingungen die Acetogenese nicht der bevorzugte Stoffwechselweg ist, sondern die Elektronen in Gegenwart alternativer terminaler Akzeptoren auf diese umgeleitet werden. Die für die Nutzung dieser Elektronenakzeptoren notwendigen Komponenten werden nicht konstitutiv produziert. So wird beispielsweise die Fähigkeit zur Nitratreduktion in *M. thermoacetica* oder zur Caffeatreduktion in *A. woodii* erst in Gegenwart des jeweiligen Akzeptors induziert (Fröstl *et al.*, 1996; Imkamp und Müller, 2002). Die zugrunde liegenden regulatorischen Mechanismen dieser Induktion sowie der Umleitung des Elektronenflusses sind bisher weitgehend unbekannt.

In Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass Nitrat-supplementierte Kulturen von *M. thermoacetica* oder *M. thermoautotrophica* bei heterotrophem Wachstum weniger oder kein Acetat bilden (Seifritz *et al.*, 1993), wurde gezeigt, dass autotrophes Wachstum in mineralischem Minimalmedium mit  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  in Gegenwart von Nitrat nicht mehr möglich ist (Fröstl *et al.*, 1996). Nitrat scheint offenbar den Wood-Ljungdahl-Weg zu inhibieren. Einen ersten Hinweis auf die Ursache dieser Inhibition lieferte die Entdeckung, dass Membranen von *M. thermoacetica* und *M. thermoautotrophica* aus Nitrat- oder Nitrit-supplementierten Kulturen keine *b*-Typ-Cytochrome mehr enthalten (Fröstl *et al.*, 1996, Seifritz *et al.*, 2003). Diese membranständigen Elektronenüberträger spielen bei diesen Bakterien in der Acetogenese eine essentielle Rolle bei der Reduktion von Methylentetrahydrofolat zu Methyl-THF. Über den Einfluß von Nitrat auf die Enzyme des Wood-Ljungdahl-Weges liegen widersprüchliche Daten vor. Untersuchungen von FRÖSTL *et al.* (1996) ergaben, dass bei *M. thermoacetica* die Gegenwart von Nitrat keinen Einfluß auf diese Enzyme zu haben scheint. Im Gegensatz dazu beobachteten ARENSEN *et al.* (1999) eine signifikante Abnahme der CODH/ACS- und Methyltransferase-Aktivität. Mittels Western-Blot-Analysen wurde gezeigt, dass bei Wachstum in Gegenwart von Nitrat die Menge der CODH/ACS um 50%, die Methyltransferase um 70% zurückgeht. Northern-Blot-Analysen

zeigten, dass die Regulation offenbar auf transkriptioneller Ebene erfolgt. Gene, die für Komponenten der Nitrat-Reduktion kodieren, schienen dagegen verstärkt exprimiert zu werden.

Regulatorische Funktion hinsichtlich des Elektronenflusses geht offensichtlich auch von CO<sub>2</sub> aus. So kann *M. thermoautotrophica* Dimethylsulfoxid nur unter CO<sub>2</sub>-Mangelbedingungen als terminalen Akzeptor nutzen (Beaty und Ljungdahl, 1991).

*Clostridium formicoaceticum* kann mit Fumarat als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen. Das Bakterium setzt in Abwesenheit von CO<sub>2</sub> Fumarat durch Disproportionierung wie folgt um:



Die bei der Oxidation von Fumarat zu Acetat und CO<sub>2</sub> anfallenden Elektronen werden nicht auf einen externen Akzeptor übertragen, sondern für die Reduktion von weiterem Fumarat verwendet (Dorn *et al.*, 1978a). Im Gegensatz dazu bilden Fumarat-fermentierende Suspensionen von *C. formicoaceticum* in Gegenwart von CO<sub>2</sub> vermehrt Acetat und entsprechend weniger Succinat (Dorn *et al.*, 1978a). Das Bakterium kann in Abwesenheit von CO<sub>2</sub> Fumarat, unabhängig von der Disproportionierung, auch ausschliesslich als Elektronenakzeptor nutzen. Elektronen, die bei der Oxidation von Methanol oder der Methyl-Gruppe von Vanillat anfallen, werden auf Fumarat übertragen (Matthies *et al.*, 1993). In Gegenwart von CO<sub>2</sub> werden die anfallenden Elektronen allerdings preferentiell zur Acetogenese genutzt. Eine Reduktion von Fumarat zu Succinat konnte unter diesen Bedingungen nicht beobachtet werden. Nach vollständigem Verbrauch des Methanols oder Vanillats erfolgt die Disproportionierung des Fumarats zu Acetat und CO<sub>2</sub>, wobei dies allerdings nicht mit einer weiteren Zunahme der Zelldichte einhergeht.

*R. productus* ist in der Lage, die *O*-Methylgruppe von Ferulat als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen, wobei die Acrylatseitenkette der Verbindung gleichzeitig als terminaler Elektronenakzeptor verwendet werden kann (Misoph *et al.*, 1996). Unter CO<sub>2</sub>-Mangelbedingungen setzt das Bakterium zunächst Ferulat vollständig zu Hydroferulat und Hydrocafeat um, wobei nur geringe Mengen Acetat synthetisiert werden. Einhergehend mit einem Anstieg der Acetatsynthese erfolgt dann die Umsetzung des Hydroferulats. Die

Zelldichte nimmt dabei nur noch geringfügig zu. In Gegenwart von CO<sub>2</sub> wurden die Elektronen gleichermaßen zur Bildung von Acetat und zur Reduktion von Ferulat genutzt. Regulatorische Mechanismen, die eine gleichzeitige und daher energetisch ungünstigere Nutzung von zwei Elektronenakzeptoren verhindern, existieren bei *R. productus* offensichtlich nicht. Die Aktivität von für die Umsetzung von Phenylacrylaten notwendigen Enzymen scheint durch CO<sub>2</sub> beeinflusst zu sein. Zellen, die mit Ferulat in Gegenwart von CO<sub>2</sub> gewachsen waren, wiesen stark verminderte *O*-Demethylase- und Phenylacrylatreduktase-Aktivität auf.

Inhibitorische Effekte durch CO<sub>2</sub> konnten bei *A. woodii* im Zusammenhang mit der Nutzung von Caffeat als terminalen Elektronenakzeptor nicht beobachtet werden (Tschech und Pfennig, 1984). Auch in Gegenwart von CO<sub>2</sub> wurden die Elektronen von Substraten wie Formiat oder Methanol auf Caffeat übertragen, was mit verringerter Acetatbildung einherging.

## **2. Mechanismen der Generierung eines transmembranen Na<sup>+</sup>-Potentials im Zuge der H<sub>2</sub>-abhängigen Caffeatreduktion in *A. woodii***

Die H<sub>2</sub>-abhängige Caffeatreduktion in *A. woodii* geht einher mit der Generierung eines transmembranen Na<sup>+</sup>-Gradienten (Imkamp und Müller, 2002). Dies erfordert die Gegenwart von mindestens einem membranständigen Enzym, welches das Potentialgefälle des Elektronentransportes energetisch nutzt, um Na<sup>+</sup> über die Membran zu translozieren. Es war daher zu erwarten, dass die Entfernung membrangebundener Komponenten eine starke Verminderung oder völliges Erliegen der Reduktions-Aktivität nach sich zieht. Überraschenderweise war nach Auftrennung von zellfreiem Rohextrakt, der die H<sub>2</sub>-abhängige Caffeatreduktion vermittelte, die Aktivität ausschliesslich im Cytoplasma lokalisiert und durch die Zugabe von Membranen nicht weiter zu stimulieren. Ein Grund hierfür könnte sein, dass im Zuge der Extraktpräparation membranständige, für die Reduktion von Caffeat relevante Komponenten abgeschert wurden.

Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die Caffeatreduktion in der löslichen Fraktion auch mit NADH + H<sup>+</sup> als Elektronendonator funktioniert. Daran ist wahrscheinlich das ETFP beteiligt, das später diskutiert wird. Damit blieb als ein mögliches membranständiges Glied der Elektronentransportkette z. B. die Reduktion von NAD<sup>+</sup> durch eine

membrangebundene Elektronendonator:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase. An Membranen konnte dann auch eine NADH-oxidierende Aktivität nachgewiesen werden. Diese wird im Folgenden diskutiert.

## 2.1 Ionen-translozierenden NADH-Dehydrogenasen

Die Hypothese der Beteiligung eines membranständigen NADH-oxidierenden Enzyms an der Caffeatreduktion führte ferner zu der Annahme, dass das Enzym als Na<sup>+</sup>-Pumpe fungieren könnte und die Generierung des transmembranen Na<sup>+</sup>-Potentials bewerkstelligt. Mehrere Typen membranständiger, NADH-oxidierender Enzyme sind in Bakterien bekannt, die die Translokation von Ionen vermitteln bzw. für die eine solche Funktion angenommen wird. Im Folgenden werden deren Eigenschaften beschrieben. Aus Gründen der Vereinfachung werden im Folgenden alle genannten Enzyme, die *in vivo* oder *in vitro* NADH + H<sup>+</sup> oxidieren oder NAD<sup>+</sup> reduzieren und an der Membran lokalisiert sind als NADH-Dehydrogenasen bezeichnet.

Die NADH-Dehydrogenase I (NDH-I) der bakteriellen Atmungskette, einem zum Komplex I in Mitochondrien homologen Komplex, besteht, je nach Organismus, aus 13 oder 14 Untereinheiten, die durch das hochkonservierte *nuo*-Operon kodiert werden (Friedrich, 1998; Yagi *et al.*, 1998). Als Kofaktoren wurden ein nicht-kovalent gebundener FMN-Rest sowie mindestens fünf Fe-S-Cluster identifiziert. Das Enzym katalysiert den Transfer von zwei Elektronen von NADH + H<sup>+</sup> zu Ubichinon. Im Zuge dieser Reaktion erfolgt die Translokation von H<sup>+</sup> aus dem Cytoplasma. Die ermittelte H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> Stöchiometrie beträgt 1,5 (Bogachev *et al.*, 1996). Untersuchungen von KREBS *et al.* (1999), GEMPERLI *et al.* (2002, 2003) und STEUBER *et al.* (2000) lieferten Hinweise, dass die NDH-I aus *K. pneumoniae* und *E. coli* die Translokation von Na<sup>+</sup> vermittelt. Die Zugabe von NADH oder Deamino-NADH zu invertierten Membranvesikeln von *E. coli* resultierte in einer Akkumulation von Na<sup>+</sup> im Lumen der Vesikel. Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon (CCCP), einem Protonophor, hatte keinen Einfluß auf die Na<sup>+</sup>-Translokation. Die Ergebnisse der Versuche von STOLPE und FRIEDRICH (2004) widersprechen allerdings der Hypothese einer Na<sup>+</sup>-translozierenden NDH-I. Das gereinigte und in Proteolipsomen rekonstituierte Enzym aus *E. coli* fungierte ausschliesslich als H<sup>+</sup>-Pumpe und vermittelte keine Na<sup>+</sup>-Translokation. Bezüglich der Na<sup>+</sup>-Translokation durch die NDH-I in *K. pneumoniae* sind die Daten ähnlich diskrepant. Untersuchungen von BERTSOVA und BOGACHEV (2004) lieferten Hinweise, dass die

Oxidation von NADH durch die NDH-I in diesem Bakterium nicht mit der Translokation von  $\text{Na}^+$  einhergeht. *K. pneumoniae* verfügt über drei NADH-Dehydrogenasen, die sich hinsichtlich ihres Substrat-Spektrums unterscheiden. Die NDH-I sowie die durch die *nqr*-Gene kodierte NADH-Chinon-Oxidoreduktase (siehe unten) sind in der Lage sowohl NADH als auch Deamino-NADH zu oxidieren. Das dritte NADH-oxidierende Enzym, die NDH-II, kann ausschliesslich NADH als Substrat nutzen, wobei die NADH-Oxidation nicht mit der Translokation von Ionen einhergeht. Es wurde gezeigt, daß die Oxidation von Deamino-NADH durch invertierte Membranvesikel von *nou*-Deletionsmutanten durch  $\text{Na}^+$  stimulierbar war und durch Piericidin A, einem NDH-I spezifischer Inhibitor, nicht gehemmt wurde. Im Gegensatz dazu war die durch Membranvesikel einer *nqr*-Deletionsmutante vermittelte Demino-NADH-Oxidation  $\text{Na}^+$ -unabhängig und durch Piericidin A inhibierbar. Diese Beobachtung legte den Schluß nahe, daß die mit der NADH-Oxidation gekoppelte  $\text{Na}^+$ -Translokation in *K. pneumoniae* durch die NADH-Chinon-Oxidoreduktase vermittelt wird.

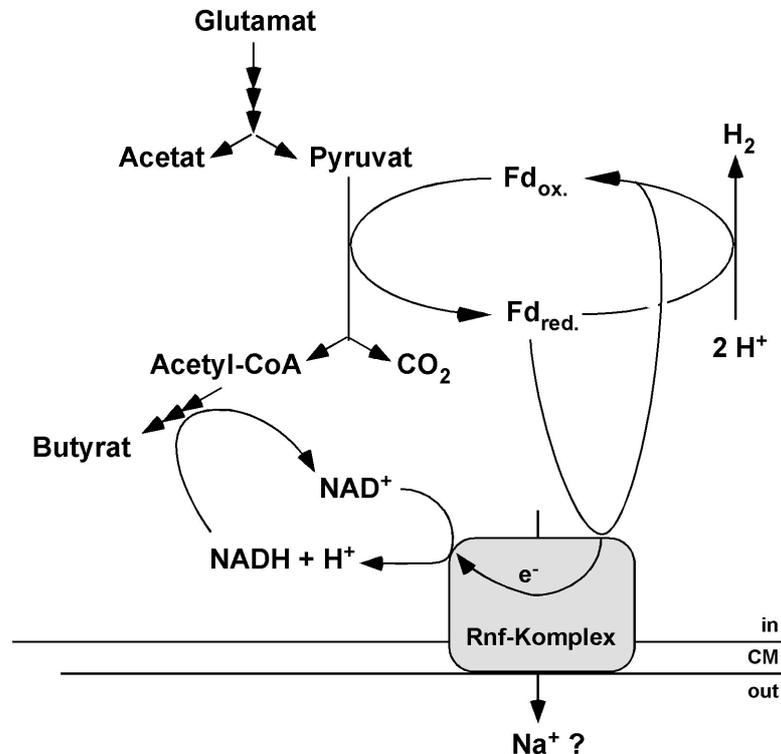
Dieser Typus Ionen-translozierender NADH-Dehydrogenasen wurde erstmals in *Vibrio alginolyticus* nachgewiesen (Unemoto *et al.*, 1977; Tokuda und Unemoto, 1981). Die NADH-Chinon-Oxidoreduktase (NQR) dieses marinen Bakteriums koppelt die exergone NADH-Oxidation mittels Ubichinon mit der Translokation von  $\text{Na}^+$ . Die initiale Oxidation von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  ist ein  $\text{Na}^+$ -unabhängiger Reaktionsschritt und kann spezifisch durch  $\text{Ag}^+$  gehemmt werden, ein Merkmal das die NQR von den NDH-I unterscheidet (Hayashi *et al.*, 1992; Bourne und Rich, 1992; Unemoto *et al.*, 1993). Dagegen ist die Reduktion des Ubichinons durch zwei Ein-Elektronentransfers strikt  $\text{Na}^+$ -abhängig und ist mit der Translokation von  $\text{Na}^+$  gekoppelt (Hayashi und Unemoto, 1987). Die Ubichinon-Reduktionsaktivität des Enzyms wird durch Chinon-Analoga wie 2-Heptyl-4-hydroxychinolin-*N*-oxide (HQNO) oder das Antibiotikum Korormicin inhibiert (Yoshikawa *et al.*, 1997; Nakayama *et al.*, 1999; Yoshikawa *et al.*, 1999). Die NQR katalysiert in der Summe die gleiche Reaktion wie die NDH-I, unterscheidet sich aber wesentlich bezüglich der Untereinheitenzusammensetzung und der Redoxkofaktoren. Das Enzym aus *V. alginolyticus* besteht aus sechs Untereinheiten (Nqr A-F), die durch sechs Gene kodiert werden, die in einem etwa 5 kBp großen Operon organisiert sind (Beattie *et al.*, 1994; Hayashi *et al.*, 1994; Nakayama *et al.*, 1998). Ein nicht-kovalent gebundenes FAD, zwei weitere, kovalent gebundene Flavine, ein Fe-S-Cluster, sowie Ubichinon-8 vermitteln als prosthetische Gruppen die Redoxreaktionen der NQR (Pfenninger-Li und Dimroth, 1995; Zhou *et al.*, 1999; Nakayama *et al.*, 2000).

Wie bereits erwähnt koppeln sowohl die NDH-I als auch die NQR die NADH-Oxidation mit der Reduktion von Chinonen und schleusen so Elektronen in membranständige Atmungsketten ein. Das Fehlen von Chinonen und anderen membrangebundenen Elektronenüberträgern in *A. woodii* läßt daher eine Beteiligung eines Enzymes vom Typ der genannten NADH-Dehydrogenasen an der Caffeatreduktion eher unwahrscheinlich erscheinen.

Eine Erweiterung der Gruppe Ionen-translozierender NADH-Dehydrogenasen stellen möglicherweise die erstmals in *Rhodobacter capsulatus* identifizierten Rnf- (*Rhodobacter nitrogen fixation*)-Komplexe dar, die durch ein sieben Gene umfassendes Operon (*rnf*ABCDGEH) kodiert werden (Schmehl *et al.*, 1993; Jouanneau *et al.*, 1998). Es wurde gezeigt, dass sechs dieser Proteine essentiell für die Stickstofffixierung sind. Insertions- und Deletionsmutanten wiesen stark verringerte Nitrogenase-Aktivität auf. Die auf Grund der abgeleiteten Aminosäuresequenzen gemachten Strukturvorhersagen lieferten erste Hinweise, dass die Rnf-Proteine einen membranständigen Komplex ausbilden. Wachstumsversuche in Gegenwart von Metronidazol führten schliesslich zu der Hypothese, dass dieser Komplex eine Oxidoreduktase darstellen könnte, die Elektronen eines unbekanntes Donors auf Ferredoxin überträgt, das als Elektronendonator der Nitrogenase fungiert (Schmehl *et al.*, 1993; Masepohl und Klipp, 1996). Die antibakterielle Verbindung Metronidazol wird durch Ferredoxin zu toxischen Derivaten reduziert (Schmidt *et al.*, 1977; Hallenbeck und Vignais, 1981). Im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen war bei Rnf-Mutanten in Gegenwart von Metronidazol das Wachstum nur geringfügig eingeschränkt, was SCHMEHL *et al.* (1993) auf den niedrigeren Gehalt der Zellen an reduziertem Ferredoxin zurückführten. Weiterführende Sequenzanalysen des *rnf*-Operons enthüllten die Ähnlichkeiten von RnfA, D, G und E zu membranständigen Untereinheiten der Na<sup>+</sup>-translozierenden NQR aus *V. alginolyticus* (Kumagai *et al.*, 1997; Jouanneau *et al.*, 1998). Zudem weist RnfC ein NADH- und ein FMN-Bindemotiv auf, wie sie in bakteriellen und mitochondrialen NDH-I zu finden sind. KUMAGAI *et al.* (1997) postulieren daher, dass die Rnf-Proteine einen membranständigen Komplex ausbilden, der die NADH-abhängige Reduktion von Ferredoxin vermittelt. Als Triebkraft für diese endergone Reaktion dient dabei das Na<sup>+</sup>- (oder H<sup>+</sup>) Potential.

Gencluster, die eine hohe Ähnlichkeit bezüglich der genetischen Organisation und der Sequenz des *rnf*-Operons aus *R. capsulatus* aufweisen, finden sich auch in zahlreichen Bakterien, die nicht in der Lage sind, Stickstoff zu fixieren, darunter *E. coli*, *H. influenzae* oder *C. tetani* (Fleischmann *et al.*, 1995; Kumagai *et al.*, 1997; Brüggemann *et al.*, 2003). Aus Membranen von *C. tetanomorphum* wurde eine NADH-Dehydrogenase gereinigt, deren

Untereinheiten große Ähnlichkeiten zu den Rnf-Proteinen aus *C. tetani* aufweisen (Kim *et al.*, 2004; Jayamani *et al.*, 2005). Das Enzym vermittelt *in vitro* neben der NADH-abhängigen Reduktion artifizierlicher Akzeptoren wie Kaliumhexacyanoferrat die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  durch reduziertes Ferredoxin. Der Rnf-Komplex in *C. tetanomorphum* spielt wahrscheinlich eine zentrale Rolle bei der Aminosäurefermentation (Kim *et al.*, 2004; Boiangiu *et al.*, 2005). Das Bakterium setzt Glutamat zu Pyruvat und Acetat um, Pyruvat wird dann durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu  $\text{CO}_2$  und Acetyl-CoA umgewandelt. Letzteres wird weiter zu Butyrat umgesetzt. HÄRTEL *et al.* (1996) zeigten, dass etwa 20% des reduzierten Ferredoxins, das im Zuge der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase-Reaktion entsteht, durch Reduktion von  $\text{H}^+$  zu  $\text{H}_2$  regeneriert wird. Die restlichen 80% fungieren als Elektronendonator bei der Bildung von Butyrat. KIM *et al.* (2004) postulierten, dass der Rnf-Komplex dabei Ferredoxin oxidiert und  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  reduziert, das für die reduktiven Prozesse der Butyratbildung benötigt wird. Damit einhergehend wird die Möglichkeit diskutiert, dass diese als Ferredoxin- $\text{NAD}^+$ -Oxidoreduktase (FNOR) fungierende NADH-Dehydrogenase die exergone Ferredoxin-abhängige NADH-Bildung mit der Translokation von  $\text{Na}^+$  koppelt (Abb. 32).



**Abb. 32. Hypothetisches Schema der Glutamatverwertung in *C. tetanomorphum* unter Beteiligung des membranständigen Rnf-Komplexes.** Das Schema gibt nicht die korrekten Stöchiometrien der Glutamatverwertung wieder.  $\text{Fd}_{\text{red./ox.}}$ , Ferredoxin, reduziert/oxidiert; CM, Cytoplasmamembran. Erläuterung, siehe Text.

Das Enzym würde also in die entgegengesetzte Richtung funktionieren, wie es für den Rnf-Komplex aus *R. capsulatus* postuliert wurde (Kumagai *et al.*, 1997). Allerdings konnte in einem Bereich von 50  $\mu\text{M}$  bis 50 mM keine Abhängigkeit der Abhängigkeit von  $\text{Na}^+$  gefunden werden, was einen Hinweis auf die Funktion als  $\text{Na}^+$ -Pumpe darstellen würde. Dies spricht gegen eine Funktion als  $\text{Na}^+$ -Pumpe könnte aber auch auf einen sehr niedrigen  $K_m$  des Enzyms für  $\text{Na}^+$  zurückzuführen sein. Die Rekonstituierung des gereinigten Enzyms in Proteoliposomen sollte Aufschluß darüber geben, ob im Zuge der Reduktion von  $\text{NAD}^+$  durch reduziertes Ferredoxin Ionen transloziert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen enzymatischer Aktivitäten in *A. woodii* ergaben, dass gewaschene Membranen neben der NADH-abhängigen Reduktion von artifiziellen Mediatoren auch die Ferredoxin-abhängige Reduktion von  $\text{NAD}^+$  vermitteln. Obwohl die von NADH-Dehydrogenasen katalysierten Reaktionen generell reversibel sind, ist unklar ob beide Aktivitäten durch das selbe Enzym bewerkstelligt werden. Dennoch weist diese Beobachtung auf die Gegenwart einer membranständigen Ferredoxin- $\text{NAD}^+$ -Oxidoreduktase in *A. woodii* hin. Im Folgenden wird die Beteiligung eines solchen Enzyms an der  $\text{H}_2$ -abhängigen Caffeatreduktion und die weiteren Hinweise auf dessen Gegenwart erörtert.

## **2.2 Die mögliche Rolle einer Ferredoxin- $\text{NAD}^+$ -Oxidoreduktase (FNOR) bei der $\text{H}_2$ -abhängigen Caffeatreduktion in *A. woodii***

Der initiale Schritt der Reaktionssequenz  $\text{H}_2 + \text{Caffeate} \rightarrow \text{Hydrocaffeate}$  ist die Oxidation von  $\text{H}_2$ , die durch eine Hydrogenase vermittelt wird. Unklar ist gegenwärtig, ob diese Reaktion durch ein lösliches oder membranständiges Enzym vermittelt wird. Die Gegenwart einer löslichen Fe-Hydrogenase wurde sowohl biochemisch als auch molekularbiologisch nachgewiesen (Ragsdale und Ljungdahl, 1984; Dengl, 2004). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die von RAGSDALE und LJUNGD AHL (1984) aus *A. woodii* gereinigte Hydrogenase neben artifiziellen Mediatoren auch Ferredoxin als Elektronenakzeptor nutzen kann. Es ist daher denkbar, dass die initiale  $\text{H}_2$ -Oxidation mit der Bildung von reduziertem Ferredoxin einhergeht. Ähnlich der FNOR in *C. tetanomorphum*, die  $\text{NADH} + \text{H}^+$  für reduktive Prozesse der Buttersäurebildung bereitstellt, könnte eine FNOR in *A. woodii* das durch die Hydrogenase reduzierte Ferredoxin zur Bildung von  $\text{NADH} + \text{H}^+$

nutzen, das als Elektronendonator für die Reduktion des terminalen Akzeptors Caffeat fungiert. Die bei der Untersuchung der Caffeatreduktion in zellfreien Systemen beobachteten hohen spezifischen Aktivitäten der NADH-abhängigen Caffeatreduktion legen eine derartige Funktion für NADH nahe.

Eine FNOR könnte in *A. woodii*, wie für *C. tetanomorphum* diskutiert, für die Generierung des transmembranen  $\text{Na}^+$ -Potentials verantwortlich sein, dass im Zuge der  $\text{H}_2$ -abhängigen Reduktion von Caffeat aufgebaut wird. Die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  durch Ferredoxin ist eine exergone Reaktion (- 20 kJ/mol) und könnte mit der Translokation von  $\text{Na}^+$  aus dem Cytoplasma gekoppelt werden. Die Stimulierung einer gegebenen Reaktion oder Reaktionssequenz durch  $\text{Na}^+$  kann als möglicher Hinweis auf ein  $\text{Na}^+$ -translozierendes Enzym gewertet werden. In vorangegangenen Untersuchungen mit ruhenden Zellen war bereits gezeigt worden, dass die Gesamtreaktion  $\text{H}_2 + \text{Caffeate} \rightarrow \text{Hydrocaffeate}$  strikt  $\text{Na}^+$ -abhängig ist (Imkamp und Müller, 2002). Der ermittelte  $K_m$ -Wert für  $\text{Na}^+$  betrug dabei 380  $\mu\text{M}$ . Im Folgenden wurde der Einfluß von  $\text{Na}^+$  auf die Aktivität des membranständigen NADH-oxidierenden Enzyms untersucht. Die Kaliumhexacyanoferrat-vermittelte NADH-Oxidation an gewaschenen Membranen unterlag keiner Stimulierung durch  $\text{Na}^+$  und war in Abwesenheit (200  $\mu\text{M}$ ) wie Gegenwart (20 mM NaCl) identisch. Unter der Annahme, dass die NADH-Oxidation von einer  $\text{Na}^+$ -translozierenden FNOR katalysiert wird, besteht auch die Möglichkeit, dass die durch artifizielle Mediatoren vermittelte Reaktion keiner  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit unterliegt, da die Elektronen bereits vor dem eigentlichen  $\text{Na}^+$ -translozierenden Schritt abgegriffen werden. Die ausbleibende Stimulierung der Aktivität könnte aber auch auf einen sehr niedrigen  $K_m$ -Wert des Enzyms für  $\text{Na}^+$  unter „zellfreien“ Bedingungen hinweisen.  $\text{Na}^+$ -freie Versuchsbedingungen sind generell schwer zu etablieren. Für die Herstellung von Puffern verwendetes destilliertes Wasser und Chemikalien oder Glaswaren stellen Quellen für  $\text{Na}^+$ -Kontaminationen dar. Der Puffer, der für die Untersuchung der  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit membranständiger NADH-oxidierender Aktivität verwendet wurde, hatte eine  $\text{Na}^+$ -Konzentration von 200  $\mu\text{M}$ . Liegt der  $K_m$ -Wert des Enzyms deutlich darunter, führt die Zugabe von weiterem NaCl zu keiner Stimulierung der Aktivität.

Wie oben beschrieben weisen die Rnf-Komplexe große Ähnlichkeit zu den  $\text{Na}^+$ -translozierenden NADH-Chinon-Oxidoreduktasen auf, zu deren Charakteristika die Inhibition durch nanomolare Konzentrationen an  $\text{Ag}^+$  gehört (Hayashi *et al.*, 1992; Unemoto *et al.*, 1993; Steuber *et al.*, 1997; Nakayama *et al.*, 1999). Ob die NADH-oxidierende oder die  $\text{NAD}^+$ -reduzierende Aktivität der FNOR aus *C. tetanomorphum* oder anderer Rnf-Oxidoreduktasen durch  $\text{Ag}^+$  gehemmt wird, ist nicht bekannt. Auch die

NADH:Kaliumhexacyanoferrat-Oxidoreduktase-Aktivität an Membranen von *A. woodii* wurde durch  $\text{Ag}^+$  gehemmt. Dies kann als ein erster Hinweis auf ein Enzym interpretiert werden, dass möglicherweise strukturelle Ähnlichkeiten zu den  $\text{Na}^+$ -translozierenden NQR aufweist. Da die Versuche mit gewaschenen Membranen durchgeführt wurden und bis zur vollständigen Hemmung der Aktivität relativ hohen Konzentrationen  $\text{Ag}^+$  ( $\mu\text{M}$ ) eingesetzt werden mussten, kann eine unspezifische Inhibition eines membranständigen, NADH-oxidierenden Enzyms allerdings nicht ausgeschlossen werden. Die Untersuchungen zur  $\text{Ag}^+$ -Hemmung der Ferredoxin-abhängigen  $\text{NAD}^+$ -Reduktion lassen keine eindeutigen Schlüsse zu. Das verwendete Testsystem erwies sich als nicht geeignet, um die Inhibition der postulierten FNOR durch  $\text{Ag}^+$  zu untersuchen. Die Hemmung der Ferredoxin- $\text{NAD}^+$ -Reduktase-Aktivität könnte auf die beobachtete Wechselwirkung des  $\text{Ag}^+$  mit Ti-(III)-Citrat, das als artifizieller Elektronendonator für das Ferredoxin verwendet wurde, zurückzuführen sein oder einer Inaktivierung des Ferredoxins durch  $\text{Ag}^+$  zu Grunde liegen.

Zur Überprüfung der Hypothese einer membranständigen,  $\text{Na}^+$ -translozierenden FNOR sind weitere Versuche notwendig. Ein erster Schritt wäre dabei die Untersuchung der  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit der Ferredoxin-vermittelten  $\text{NAD}^+$ -Reduktion an Membranen von *A. woodii*. Ob diese Reaktion mit der Generierung eines transmembranen  $\text{Na}^+$ -Gradienten einhergeht, könnte mit Hilfe von invertierten Membranvesikeln untersucht werden. Ferner könnte überprüft werden, ob die Oxidation von reduziertem Ferredoxin und die daran gekoppelte Reduktion von  $\text{NAD}^+$  mit der Aufnahme von  $^{22}\text{Na}^+$  gekoppelt ist.

### 3. Elektronentransfer-Flavoproteine als Mediatoren von Redoxreaktionen

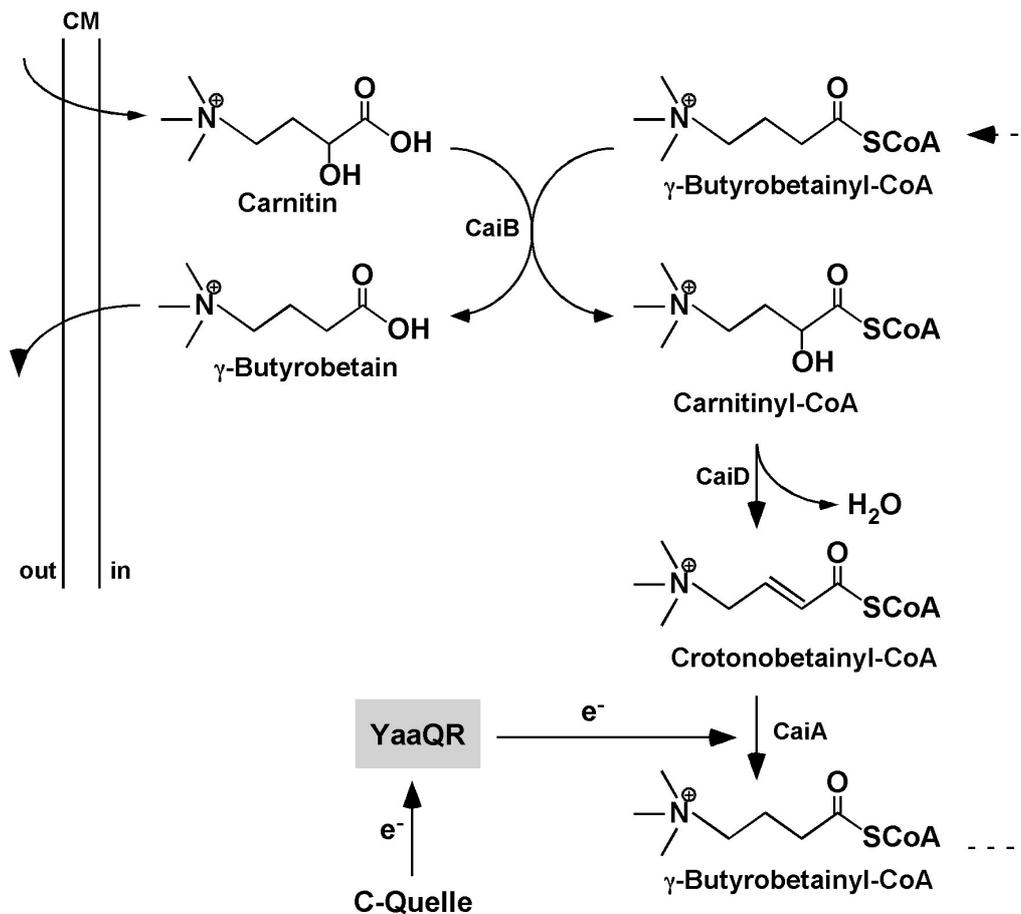
Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese die Caffeatin-induzierten Proteine EtfA und EtfB in *A. woodii* identifiziert. Korrespondierende Genfragmente wurden amplifiziert und kloniert. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit in Datenbanken hinterlegten Sequenzen, zeigte, dass es sich bei den beiden Proteinen wahrscheinlich um die große  $\alpha$ - (EtfA) und die kleine  $\beta$ -Untereinheit (EtfB) eines Elektronentransfer-Flavoproteins handelt. Somit konnte erstmals ein potentieller Elektronenüberträger in einem  $\text{Na}^+$ -abhängigen, acetogenen Bakterium identifiziert werden.

Die EtfAB-Proteine bilden zusammen mit den FixAB-Proteinen, wie sie in verschiedenen  $\text{N}_2$ -fixierenden Bakterien vorkommen, und dem YaaQR-Protein aus *E. coli* eine Gruppe heterodimerer Elektronenüberträger (Tsai und Saier Jr., 1995). Die Übereinstimmungen in der

Primärsequenz liegen zwischen 25% bei funktionell unterschiedlichen Proteinen und 65 – 70% bei funktionell ähnlichen Elektronenüberträgern. Allgemein weisen die Bereiche die größten Übereinstimmungen auf, die an der Koordinierung der beiden Kofaktoren FAD und AMP beteiligt sind (Chen und Swenson, 1994; Roberts *et al.*, 1995; Weidenhaupt *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 1999).

WEIDENHAUPT *et al.* (1996) teilten diese Gruppe von Proteinen in *housekeeping*-Elektronenüberträger ein und solche, die ein Organismus nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen oder in Gegenwart bestimmter Kohlenstoffquellen produziert. Erstere Gruppe repräsentieren die pro- und eukaryontischen EtfAB-Proteine, die als Elektronenakzeptor für verschiedene Dehydrogenasen der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren oder des Aminosäurekatabolismus fungieren (Roberts *et al.*, 1996). Die am besten untersuchten Beispiele dieser Art stellen die Elektronentransfer-Flavoproteine aus *P. denitrificans* und aus *H. sapiens* dar (Finocchiaro *et al.*, 1988; Bedzyk *et al.*, 1993; Finocchiaro *et al.*, 1993). Die Kristallstrukturen beider Proteine wurden aufgeklärt (Roberts *et al.*, 1996, 1999). Das reduzierte Elektronentransfer-Flavoprotein wird anschliessend durch eine membranständige ETF-Ubichinon-Oxidoreduktase (ETF-Q-OR) reoxidiert, welche die Elektronen auf Ubichinon überträgt und so in die Atmungskette einschleust (Frerman, 1987). Konstitutiv produzierte Elektronentransfer-Flavoproteine spielen nicht nur eine Rolle als Elektronenakzeptoren. Im Metabolismus von Buttersäure-bildenden Bakterien wie *Megasphaera elsdenii* (früher: *Peptostreptococcus elsdenii*), *Butyrivibrio fibrisolvens* und verschiedenen Clostridien fungieren diese Proteine als Elektronendonatoren für reduktive Prozesse (Whitfield und Mayhew, 1974; Boynton *et al.*, 1996; O'Neill *et al.*, 1998; Asanuma *et al.*, 2005).

EtfAB aus *A. woodii* gehört zur Gruppe der induzierten Elektronentransfer-Proteine. Mittels Western-Blot-Analysen wurde gezeigt, dass das Protein nur in Gegenwart von Caffeat und anderen Phenylacrylaten in der Zelle nachweisbar war. Die Induktion eines Elektronentransferierenden Proteins durch einen alternativen terminalen Elektronenakzeptor wurde auch für *E. coli* beschrieben. Unter anaeroben Bedingungen erfolgt in Gegenwart des Akzeptors Carnitin die Induktion der für das YaaQR-Protein kodierenden Gene und des *cai*-Operons, das für die Komponenten der Carnitin-Reduktion kodiert (Eichler *et al.*, 1995; Buchet *et al.*, 1998). In Gegenwart energetisch günstigerer Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Fumarat oder DMSO wird diese Induktion allerdings reprimiert. Für das YaaQR-Protein wurde eine Funktion als Elektronendonator der Crotonobetainyl-CoA Reduktase postuliert, die den terminalen Schritt der Carnitin-Reduktion katalysiert (Abb. 33; Walt und Kahn, 2002).



**Abb. 33. Hypothetisches Schema der Carnitin-Reduktion in *E. coli* unter anaeroben Bedingungen (nach Walt und Kahn, 2002).** Carnitin wird in die Zelle transportiert und unter Vermittlung von CaiB im Zuge einer CoA-Transfer-Reaktion zu Carnitiny-CoA umgewandelt. Dabei entsteht gleichzeitig gamma-Butyrobetain, das aus der Zelle ausgeschleust wird. CaiD setzt das Carnitiny-CoA zu Crotonobetainyl-CoA um. Letzteres wird von CaiA, der postulierten Crotonobetainyl-CoA Reduktase, zu gamma-Butyrobetainyl-CoA reduziert. Die für diesen Reaktionsschritt notwendigen Elektronen werden wahrscheinlich vom YaaQR-Protein geliefert, das durch Oxidation des Wachstumssubstrates freigesetzt werden. CM, Cytoplasmamembran.

In *Methylophilus methylotrophus* wird die Produktion von EtfAB durch die Kohlenstoffquelle reguliert (Davidson *et al.*, 1986). Nur bei Wachstum auf Trimethylamin erfolgt die Induktion des Proteins. Es fungiert als Elektronenakzeptor einer koinduzierten Trimethylamindehydrogenase, welche die oxidative *N*-Demethylierung von Trimethylamin zu Dimethylamin und Formaldehyd katalysiert (Steenkamp und Mallinson, 1976).

Auch die Produktion der Elektronentransfer-Flavoproteine FixAB verschiedener N<sub>2</sub>-fixierender Bakterien erfolgt nicht konstitutiv. Die Funktion von FixAB ist unklar. Sie steht aber offensichtlich in engem Zusammenhang mit der Stickstofffixierung. Die Deletion von *fixA* oder *fixB* geht einher mit dem Verlust dieser Fähigkeit (Weidenhaupt *et al.*, 1996).

FixAB ist möglicherweise Teil einer Transportkette, die Elektronen einer Kohlenstoffquelle zur Nitrogenase transferiert (Gubler und Hennecke, 1986; Earl *et al.*, 1987; Kaminski *et al.*, 1988; Scott und Ludwig, 2004). Die Expression der entsprechenden Gene erfolgt zusammen mit anderen für die Stickstofffixierung relevanten Genen nur unter Sauerstoffmangelbedingungen und ist abhängig vom Regulatorprotein NifA sowie dem  $\sigma$ -Faktor  $\sigma^{54}$  (Szeto *et al.*, 1984; Gubler und Hennecke, 1988; Arigoni *et al.*, 1991).

Die gezeigte spezifische Induktion des Elektronentransfer-Flavoproteins in *A. woodii* durch Caffeat und andere Phenylacrylate ist ein deutlicher Hinweis auf eine Rolle des Proteins bei der Reduktion dieser alternativen Elektronenakzeptoren. Das heterodimere EtfAB-Protein stellt möglicherweise das zentrale Elektronen-*Inputmodul* der Phenylacrylat-Reduktion dar. In Analogie zum humanen Protein, das die Elektronen verschiedenster mitochondrialer Dehydrogenasen über die ETF-Q-OR in die Atmungskette einschleust, könnten in *A. woodii* die Elektronen verschiedenster Donatoren letztlich durch  $\text{NADH} + \text{H}^+$  auf das EtfAB-Protein übertragen werden, welches sie an eine terminale Reduktase weiterleitet. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass  $\text{NADH} + \text{H}^+$  als Donor für die Reduktion von Caffeat fungieren kann. Zudem wurde für verschiedene pro- und eukaryontische Elektronentransfer-Flavoproteine die Fähigkeit beschrieben,  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu oxidieren und die Elektronen auf Enzyme zu übertragen, die Reduktionsreaktionen vermitteln (Komuniecki *et al.*, 1989; O'Neill *et al.*, 1998; Hetzel *et al.*, 2003; vgl. hierzu auch 4.). Unklar ist allerdings, wie  $\text{NADH} + \text{H}^+$  mit dem Elektronentransfer-Flavoprotein interagiert und Elektronen auf den Redoxkofaktor FAD übertragen werden könnten. Die genaue Rolle des AMP-Restes, der als Bestandteil verschiedener EtfAB-Heterodimere identifiziert wurde (Sato *et al.*, 1993; DuPlessis *et al.*, 1994; Roberts *et al.*, 1996; Griffin *et al.*, 1997) ist unbekannt. ROBERTS *et al.* (1999) schlugen vor, dass es sich bei der AMP-Bindestelle um eine rudimentäre NADH-Bindestelle eines entwicklungsgeschichtlich älteren Elektronentransfer-Flavoprotein handeln könnte. Die *in silico* vorgenommene Überlagerung des AMP-Restes von NADH mit der AMP-Bindestelle des Proteins aus *P. denitrificans*, das  $\text{NADH} + \text{H}^+$  selbst nicht nutzen kann, zeigte, dass sich der Nikotinamide-Ring in 5 Å Entfernung zum Flavinring des FAD-Cofaktors befände. Diese Distanz würde den direkten Elektronentransfer ermöglichen. Interessanterweise bindet das NADH-oxidierende Elektronen-Transfer-Flavoprotein aus *M. elsdenii* kein AMP (Mayhew und Massey, 1971). In der Primärsequenz der  $\beta$ -Untereinheit sind aber drei der acht Reste, die in *H. sapiens* das AMP koordinieren, konserviert. Ein weiterer Aminosäurerest tritt durch eine konservative Substitution in Erscheinung (O'Neill *et al.*, 1998). Daneben finden sich längere Sequenzabschnitte der AMP-

Bindestelle auch in der Sequenz aus *M. elsdenii* wieder. Daher wird die Möglichkeit diskutiert, dass in *M. elsdenii* die  $\beta$ -Untereinheit des Elektronentransfer-Flavoproteins die Bindestelle des  $\text{NADH} + \text{H}^+$  darstellt (O'Neill *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 1999). Da das native Protein bereits kristallisiert wurde, ist eine Klärung dieser Frage durch die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse zu erwarten (Sharkey *et al.*, 1997).

Auch EtfB aus *A. woodii* weist neben mehreren Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz drei konservierte Reste auf, die in *H. sapiens* die Koordinierung des AMP-Restes bewerkstelligen. Ob in *A. woodii* die  $\beta$ -Untereinheit als AMP- oder, wie für *M. elsdenii* postuliert, als NADH-Bindestelle fungiert, kann gegenwärtig nicht geklärt werden. Weitere Bereiche, die die von WIERENGA *et al.* (1985) postulierten Kriterien einer Dinukleotid-Bindestelle erfüllen, wurden sowohl in den verfügbaren Sequenzen des EtfB-Proteins als auch des EtfA-Proteins nicht identifiziert.

#### **4. Betrachtungen zur Caffeat-reduzierenden Aktivität in *A. woodii***

*A. woodii* kann neben Caffeat eine Vielzahl von Phenylacrylaten als terminale Elektronenakzeptoren nutzen und die Acrylatseitenkette dieser Verbindungen reduzieren. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen mit Suspensionen ruhender Zellen lassen den Schluß zu, dass die Reduktion dabei nicht durch für das jeweilige Phenylacrylat spezifische Enzyme, sondern durch eine universell-fungierende, induzierbare Reduktase katalysiert wird. Die Identifikation einer solchen „Phenylacrylat-Reduktase“ und die Bestimmung ihrer Lokalisation war im Zuge dieser Arbeit nicht gelungen. Die Beobachtung, dass die Caffeat-reduzierende Aktivität ausschliesslich im Cytoplasma zu finden war, könnte für ein lösliches Enzym sprechen. In Bakterien verschiedenster Gattungen sind in den letzten Jahren cytoplasmatische oder periplasmatische Reduktasen identifiziert worden, die zur Phenylacrylatreduktion analoge Reaktionen vermitteln.

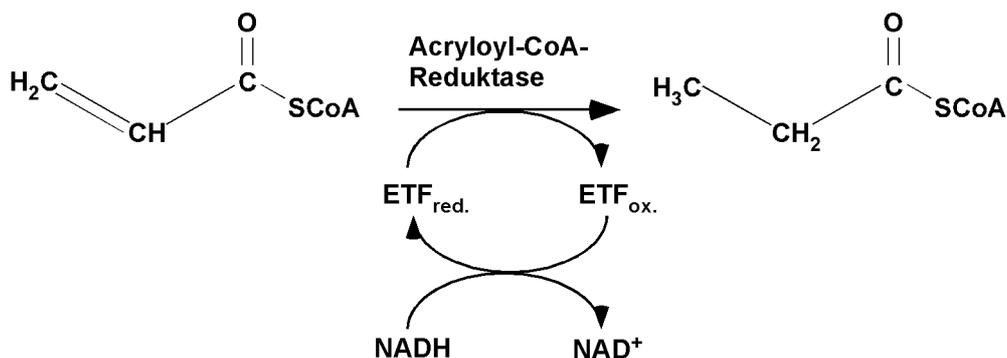
*Geobacter sulfurreducens* kann bei Wachstum auf Acetat Acrylate als Elektronenakzeptoren nutzen (Mikoulinskaia *et al.*, 1999). Aus dem Periplasma des Bakteriums wurde ein Enzym isoliert, das die Reduktion von Methacrylat und Acrylat, aber auch verschiedener ungesättigter Fettsäuren katalysiert. Phenylacrylate, wie Caffeat oder Ferulat stellen für diese Reduktase allerdings keine Substrate dar. MIKOULINSKAIA *et al.*

(1999) postulierten, dass die bei der Umsetzung von Acetat freiwerdenden Elektronen über Menachinon und ein periplasmatisches Cytochrom *c* auf die Reduktase übertragen werden.

In *W. succinogenes* vermitteln die Genprodukte des *fccABC*-Operons wahrscheinlich die Reduktion von Methacrylat und Acrylat (Gross *et al.*, 2001). Das Gen *fccA* kodiert dabei für eine hypothetische Reduktase, die hohe Ähnlichkeiten zu löslichen Fumarat-Reduktasen aufweist, wie sie beispielsweise in *Shewanella frigidimarina* (früher: *Shewanella putrefaciens*) zu finden sind (Simon *et al.*, 1998). Der Transfer von Elektronen auf die Methacrylat-Reduktase erfolgt auch in *W. succinogenes* offenbar durch *c*-Typ-Cytochrome, die durch *fccB* und *fccC* kodiert werden (Gross *et al.*, 2001). Die metabolische Funktion des *fccABC*-Operons ist aber immer noch unklar.

Durch vergleichende 2D-Gelelektrophorese konnte in dem Bodenbakterium *Burkholderia* sp. WS ein Enzym identifiziert werden, das die Reduktion halogener Acrylate katalysiert (Kurata *et al.*, 2005). Als Elektronendonator fungiert dabei  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ,  $\text{NADH} + \text{H}^+$  stellt für das Enzym allerdings kein Substrat dar.

Eine interessante Parallele zur postulierten Reduktion von Phenylacrylaten unter Vermittlung eines Elektronentransfer-Flavoproteins in *A. woodii* ist in *C. propionicum* zu finden. Im Zuge der Umsetzung von Alanin katalysiert eine Acryloyl-CoA-Reduktase die NADH-abhängige Reduktion von Acryloyl-CoA zu Propionyl-CoA (Abb. 34; Hetzel *et al.*, 2003).



**Abb. 34.** Die NADH-abhängige Reduktion von Acryloyl-CoA zu Propionyl-CoA.  $\text{ETF}_{\text{ox./red.}}$ , Elektronentransfer-Flavoprotein, oxidiert/reduziert; (nach Hetzel *et al.*, 2003)

Als Mediator für die Elektronen des  $\text{NADH} + \text{H}^+$  fungiert dabei ein Elektronentransfer-Flavoprotein, das zusammen mit der Reduktase einen Komplex ausbildet. Basierend auf der Primärsequenz kann die Acryloyl-CoA-Reduktase den Acyl-CoA-Dehydrogenasen zugeordnet werden. In Mitochondrien katalysieren verschiedene Enzyme dieser Gruppe von

Flavoproteinen die  $\beta$ -Oxidation ungesättigter Fettsäuren und übertragen die freiwerdenden Reduktionsäquivalente auf ein Elektronentransfer-Flavoprotein (Thorpe, 1991). In *M. elsdenii* und anderen Buttersäure-bildenden Bakterien vermittelt eine Acyl-CoA-Dehydrogenase eine analoge, reduktive Rückreaktion. Die Butyryl-CoA-Dehydrogenase katalysiert die NADH-abhängige Reduktion von Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA, der Vorstufe der Buttersäure. Als Mediator fungiert auch dabei ein Elektronentransfer-Flavoprotein (Boynton *et al.*, 1996; O'Neill *et al.*, 1998; siehe auch Abb. 35 A.). Die Übereinstimmungen der postulierten Reaktionssequenz für die NADH-abhängige Reduktion von Phenylacrylaten unter Vermittlung eines Elektronentransfer-Flavoproteins (vgl. Diskussion 3.) mit den von Acyl-CoA-Dehydrogenasen katalysierten Reaktionen, können als Anhaltspunkt auf die Natur der hypothetischen Phenylacrylat-Reduktase in *A. woodii* herangezogen werden. Die Analogie wird allerdings hinsichtlich der Substrate eingeschränkt. Acyl-CoA-Dehydrogenasen setzen CoA-aktivierte Kohlenwasserstoffe um, die im Zuge kataboler und anaboler Stoffwechselreaktionen gebildet werden. Die Aktivierung eines Phenylacrylats, das als terminaler Akzeptor einer Elektronentransportkette dient, erscheint dagegen aus mechanistischer Sicht nicht sinnvoll.

Interessante Analogien zur Phenylacrylatreduktion in *A. woodii* finden sich auch bei Enoatreduktasen, einer Gruppe von Enzymen, die in verschiedenen Spezies des Genus *Clostridia* nachgewiesen wurde. Sie katalysieren die NADH-abhängige Reduktion von C-C-Doppelbindungen nicht-aktivierter 2-Enoate (Rohdich *et al.*, 2001). Enoatreduktasen zeichnen sich im Gegensatz zu Acyl-CoA-Dehydrogenasen durch ein breites Substratspektrum aus, das aber abhängig vom jeweiligen Bakterium stark variiert. Neben Enoaten können ungesättigte Aldehyde, zyklische Ketone und Methylketone reduziert werden (Simon, 1991). Die von Enoat-Reduktasen und Acyl-CoA-Dehydrogenasen vermittelten Reaktionen sind prinzipiell gleich, unterscheiden sich aber hinsichtlich der optischen Aktivität der Produkte (Abb. 35).

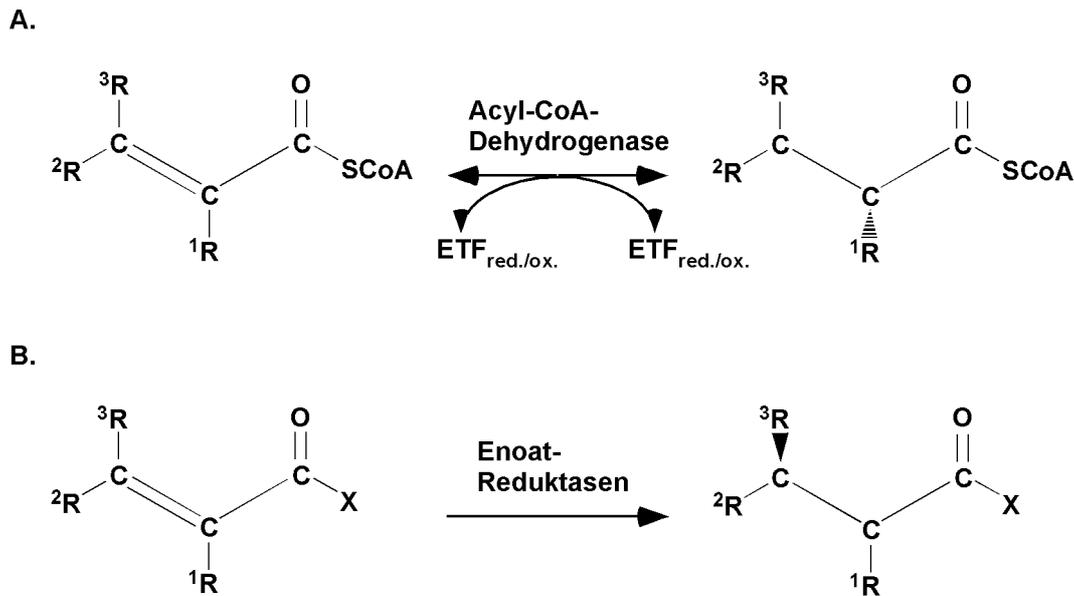


Abb. 35. Vergleich der von A. Acyl-CoA Dehydrogenasen und B. Enoat-Reduktasen katalysierten Reaktionen (modifiziert nach Rohdich *et al.*, 2001).  $\text{ETF}_{\text{red./ox.}}$ , Elektronentransfer-Flavoprotein, reduziert/oxidiert.

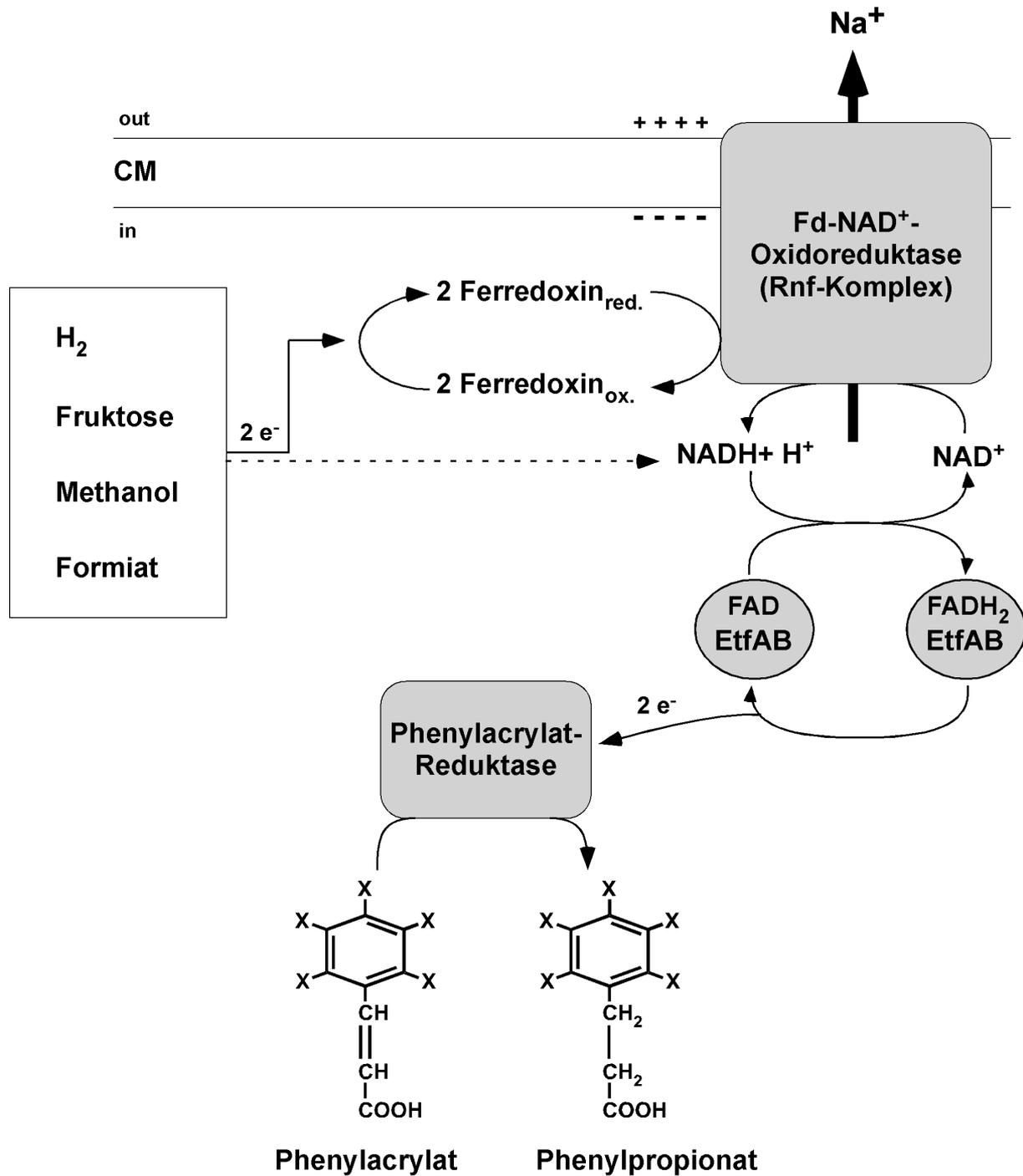
Die Enoat-Reduktase aus *C. tyrobutyricum* wurde gereinigt. Es handelt sich dabei um ein Homododekamer einer molekularen Masse von etwa 940 kDa. Jede Untereinheit enthält ein 4Fe-4S-Cluster sowie FAD und FMN (Kuno *et al.*, 1985; Simon, 1991; Caldeira *et al.*, 1996). Interessanterweise vermittelt das Enzym aus *Clostridium sporogenes* die Reduktion von Zimtsäure (Bühler *et al.*, 1980), einer Verbindung, die chemisch betrachtet wie Caffeat zu den Phenylacrylaten gehört. Eine weitere Parallele zur Phenylacrylat-reduzierenden Aktivität ist die Beobachtung, dass Enoat-Reduktasen nicht konstitutiv in der Zelle vorliegen, sondern ihre Produktion einer Induktion durch die entsprechenden Substrate unterliegt (Bader und Simon, 1980). Im Gegensatz zur postulierten Phenylacrylatreduktase in *A. woodii* spielen bei den durch Enoatreduktasen vermittelten Reaktionen Elektronentransfer-Flavoproteine allerdings keine Rolle als Mediator.

Die Phenylacrylatreduktase vereint daher möglicherweise die Eigenschaften von Acyl-CoA-Dehydrogenasen und Enoatreduktasen: Elektronen von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  werden durch ein koinduziertes Elektronentransfer-Flavoprotein auf das Enzym transferiert, welches auf Grund der breiten Substratspezifität in der Lage ist, verschiedenste Phenylacrylate zu reduzieren. Für *A. woodii* wurde ein Genfragment amplifiziert, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Übereinstimmungen zu Enoat-Reduktasen aus Bakterien verschiedener Gattungen aufweist (Dengl, 2004). Ob es sich dabei möglicherweise um eine Phenylacrylat-Reduktase handelt ist gegenwärtig unklar.

## 5. Die Phenylacrylat-Reduktion in *A. woodii* – ein Arbeitsmodell

Basierend auf den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten physiologischen, biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen und den oben diskutierten Analogien zu verschiedenen Redoxreaktionen wird das in Abb. 36 dargestellte Arbeitsmodell zur Reduktion von Caffeat und anderer Phenylacrylaten sowie die daran gekoppelte Generierung eines transmembranen  $\text{Na}^+$ -Gradienten vorgeschlagen.

Die  $\text{H}_2$ -abhängige Reduktion von Phenylacrylaten wird durch eine Ferredoxin-abhängige Hydrogenase initiiert. Ob die im Rahmen dieser Arbeit und in vorangegangenen Untersuchungen (Dengl, 2004) nachgewiesene  $\text{NAD}^+$ -abhängige Hydrogenaseaktivität dabei ebenfalls eine Rolle spielt ist unklar. Aus dieser Aktivität resultiert die membranunabhängige Bildung von NADH, was eine weitere mögliche Erklärung für die ausschliessliche Lokalisierung der Caffeatreduktion in der cytoplasmatischen Fraktion unter *in vitro*-Bedingungen darstellen könnte.



**Abb. 36. Hypothetisches Schema der Phenylacrylat-Reduktion in *A. woodii*.** Erläuterungen, siehe Text. CM, Cytoplasmamembran; X, Reste (-H, -OH, etc.)

Reduziertes Ferredoxin dient im Folgenden als Elektronendonator für eine membranständige Ferredoxin- $NAD^+$ -Oxidoreduktase (FNOR), die die Reduktion von  $NAD^+$  zu  $NADH + H^+$ , dem zentralen Mediator der Phenylacrylatreduktion, katalysiert. Diese exergone Reaktion geht einher mit der Translokation von  $Na^+$  und der Generierung eines transmembranen

elektrochemischen Potentials. Das durch Phenylacrylate induzierte Elektronentransfer-Flavoprotein (ETFP) oxidiert  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und überträgt die Elektronen auf eine koinduzierte, lösliche Phenylacrylat-Reduktase, welche die Reduktion des terminalen Akzeptors katalysiert.

Neben  $\text{H}_2$ , können Fruktose, Formiat oder Methanol als Elektronendonatoren für die Reduktion von Phenylacrylaten dienen (Bache und Pfennig, 1981; Tschech und Pfennig, 1984). Versuche mit ruhenden Zellen zeigten, dass der Transfer von Elektronen, die bei der Oxidation dieser Substrate freiwerdenden, auf Caffeat ebenfalls mit der Generierung eines transmembranen  $\text{Na}^+$ -Gradienten einhergeht, der für die Synthese von ATP genutzt werden kann (Imkamp und Müller, unveröffentlichte Daten). Bei der Umsetzung von Fruktose zu Pyruvat im Embden-Meyerhof-Parnas-Weg und der anschließenden Umwandlung des Pyruvats zu Acetyl-CoA und  $\text{CO}_2$  werden Reduktionsäquivalente in Form von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  und reduziertem Ferredoxin freigesetzt. Das gebildete  $\text{NADH} + \text{H}^+$  könnte direkt als Elektronendonator des EFTP fungieren. Das reduzierte Ferredoxin dagegen würde durch die FNOR oxidiert und ermöglicht so die energetische Kopplung der Fruktose-abhängigen Phenylacrylatreduktion.

Wie in *A. woodii* im Zuge der Umsetzung von Methanol oder Formiat reduziertes Ferredoxin entstehen könnte, ist nicht geklärt. In Abwesenheit von Phenylacrylaten erfolgt die Acetogenese aus Methanol gemäß der Gleichung



Die Methyl-Gruppe des Methanols wird wahrscheinlich auf Ebene des Methyl-THF in den Wood-Ljungdahl-Weg eingeführt (Müller *et al.*, 2004; vgl. Abb. 2). Da dieser vollständig reversibel ist, können die von der CODH/ACS benötigten Elektronen durch die sukzessive Oxidation einer Methyl-Gruppe zu  $\text{CO}_2$  gewonnen werden. Ein Reaktionsschritt, der dabei reduziertes Ferredoxin liefern könnte, ist die Oxidation von Methyl-THF zu Methylen-THF, die durch die 5,10-Methylen-THF-Reduktase katalysiert wird. In *C. formicoaceticum* vermittelt das Enzym die Rückreaktion mit reduziertem Ferredoxin als Elektronendonator (Wohlfarth *et al.*, 1990). Ferner könnte auch die von der Formiat-Dehydrogenase katalysierte Oxidation von Formiat zu  $\text{CO}_2$  in Frage kommen. SCHERER und THAUER (1978) beschrieben die partielle Reinigung eines Enzyms aus *C. pasteurianum*, das diese Reaktion Ferredoxin-abhängig vermittelt.

Möglicherweise beschränkt sich die Funktion der postulierten membranständigen FNOR nicht nur auf die Phenylacrylatreduktion. Denkbar wäre, dass das Enzym generell, auch in

Abwesenheit von Phenylacrylaten, als *input*-Modul für Elektronen von reduziertem Ferredoxin fungiert und so  $\text{NADH} + \text{H}^+$  bereitstellt, das im Wood-Ljungdahl-Weg für die Reduktion von  $\text{CO}_2$  zu Acetat genutzt wird.

## Zusammenfassung

1. Aus Fruktose-gezogenen Zellen von *A. woodii*, die in Gegenwart von Caffeat als Elektronenakzeptor gewachsen waren, wurde durch Behandlung mit Lysozym und anschließendem French-Press-Aufschluß bei niedrigem Druck ein zellfreier Rohextrakt unter strikt anaeroben Bedingungen hergestellt. Dieser katalysierte eine  $H_2$ -abhängige Caffeatreduktion mit Raten von 8,7 – 18,7 nmol/min x mg Protein. Die Aktivität war strikt ATP-abhängig. Nach einer Auftrennung des Rohextraktes in Cytoplasma- und Membranfraktion war die  $H_2$ -abhängige Caffeatreduktion ausschliesslich in der cytoplasmatischen Fraktion lokalisiert. Die Zugabe von Membranen führte zu keiner Stimulierung der Aktivität. Die Membranfraktion selbst wies keine Caffeatreduktionsaktivität auf.
2. Verschiedene Verbindungen wurden auf ihre Fähigkeit getestet, als artifizielle Elektronendonatoren für die Caffeatreduktion zu fungieren. TMPD, 1,5-Diphenylcarbazid und reduziertes Methylviologen konnten Caffeat nicht reduzieren. In Gegenwart von Phenylendiamin wurde in zellfreiem Rohextrakt und in der Cytoplasmafraktion Caffeatreduktionsaktivität beobachtet. In der Membranfraktion wurde dagegen keine Reduktion von Caffeat mit Phenylendiamin als Elektronendonator nachgewiesen.
3.  $NADH + H^+$  konnte als physiologischer Elektronendonator für die Reduktion von Caffeat fungieren. Die  $NADH$ -abhängige Caffeatreduktion war ausschliesslich in der cytoplasmatischen Fraktion lokalisiert und strikt abhängig von ATP. Die Beobachtung, dass  $NADH + H^+$  als Elektronendonator für die Caffeatreduktion fungieren kann, führte zu der Frage, wie im Zuge  $H_2$ -abhängiger Caffeatreduktion  $NADH + H^+$  gebildet wird und welche Enzyme daran beteiligt sein könnten.
4.  $NAD^+$ -abhängige Hydrogenaseaktivität wurde an Membranen und im Cytoplasma nachgewiesen. Rund 70% der Aktivität waren in der löslichen Fraktion lokalisiert.

5. Die Gegenwart einer Elektronendonator:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase in *A. woodii* wurde untersucht. Gewaschene Membranen vermittelten die Oxidation von NADH + H<sup>+</sup> mit Kaliumhexacyanoferrat oder Benzylviologen als Elektronenakzeptor. Diese Beobachtung wurde als Hinweis auf eine NAD<sup>+</sup>-Reduktase gewertet, da solche Enzyme in der Regel reversibel sind. Eine Hydrogenase konnte hierfür ausgeschlossen werden, da die NADH-oxidierende Aktivität Sauerstoff-unempfindlich war.
6. Die Aktivität des NADH-oxidierenden Enzyms konnte durch zugesetztes Na<sup>+</sup> nicht stimuliert werden. In Analogie zu Na<sup>+</sup>-translozierenden NADH:Chinon-Reduktasen wurde die NADH-oxidierende Aktivität an gewaschenen Membranen aber durch Ag<sup>+</sup> oder Cu<sup>2+</sup> in mikromolaren Konzentrationen vollständig inhibiert.
7. Membranen von *A. woodii* vermittelten die Reduktion von NAD<sup>+</sup> mit reduzierten Ferredoxin als Elektronendonator. Ob diese Aktivität durch das gleiche membranständige Enzyme katalysiert wurde, das auch die NADH-Oxidation bewerkstelligte, konnte nicht geklärt werden. Die Ferredoxin-abhängige NAD<sup>+</sup>-Reduktion wurde durch micromolare Konzentrationen Ag<sup>+</sup> vollständig inhibiert. Die Inhibition war aber wahrscheinlich unspezifischer Natur.
8. Mittels vergleichender 2D-Gelelektrophorese wurden zwei Caffeat-induzierte Proteine identifiziert. Ein Vergleich der Peptidsequenzen, die durch ESI-MS/MS-Analyse der Proteine erhalten wurden, mit in Datenbanken hinterlegten Proteinsequenzen, ergab eine große Übereinstimmung zu der großen  $\alpha$ - bzw. kleinen  $\beta$ -Untereinheit von heterodimeren Elektronentransfer-Flavoproteinen (ETFP). Die Proteine wurden mit EtfA und EtfB bezeichnet. Anhand der Peptidsequenzen von EtfA und EtfB wurden degenerierte Oligonukleotide abgeleitet, die zur Amplifikation von Fragmenten der kodierenden Gene herangezogen wurden. Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der erhaltenen PCR-Produkte untermauerte die Zuordnung von EtfA und EtfB als Untereinheiten eines ETFP.
9. Die Fähigkeit zur Caffeatreduktion ist in *A. woodii* nicht konstitutiv vorhanden, sondern wird erst durch Gegenwart des Phenylacrylats induziert. Die Spezifität dieser Induktion wurde untersucht. Suspensionen ruhender Zellen, die aus Caffeat-induzierten Zellen hergestellt worden waren, reduzierten neben Caffeat auch die

Phenylacrylate Ferulat oder *p*-Cumarsäure mit H<sub>2</sub> als Elektronendonator. Analoge Beobachtungen wurden mit Ferulat-induzierten und *p*-Cumarsäure-induzierten Zellsuspensionen gemacht. Die Ergebnisse legen den Schluß nahe, dass in *A. woodii* die Reduktion von Phenylacrylaten durch ein induzierbares enzymatisches System bewerkstelligt wird.

10. EtfA und EtfB wurden als MalE-Fusionsproteine dargestellt und gereinigt. Dagegen wurden Antiseren hergestellt. Immunologische Untersuchungen zeigten, dass die Produktion von EtfA und EtfB durch Gegenwart verschiedener Phenylacrylate induziert wird. Die Induktion war unabhängig vom Wachstumssubstrat. In Gegenwart von zu Phenylacrylaten ähnlichen Verbindungen erfolgte keine Induktion. Für EtfA und EtfB wurde eine Funktion als universeller Elektronenüberträger des Phenylacrylat-Reduktionssystems in *A. woodii* postuliert.

11. Für die H<sub>2</sub>-abhängige Reduktion von Caffeat und anderer Phenylacrylate wurde die folgende Reaktionssequenz postuliert: die Oxidation des Elektronendonors H<sub>2</sub> durch eine Hydrogenase geht einher mit der Bildung von reduziertem Ferredoxin. Dieses wird durch eine membranständige Ferredoxin-NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase oxidiert, die den Transfer der Elektronen auf NAD<sup>+</sup> mit der Translokation von Na<sup>+</sup> koppelt. Ein aus EtfA und EtfB gebildetes ETFP fungiert dann als Elektronenüberträger zwischen NADH + H<sup>+</sup> und einer löslichen Phenylacrylatreduktase.

**Literaturverzeichnis**

- Arendsen, A.F., Soliman, M.Q., und Ragsdale, S.W. (1999). Nitrate-dependent regulation of acetate biosynthesis and nitrate respiration by *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **181**: 1489-1495.
- Arigoni, F., Kaminski, P.A., Hennecke, H., und Elmerich, C. (1991). Nucleotide sequence of the *fixABC* region of *Azorhizobium caulinodans* ORS571: similarity of the *fixB* product with eucaryotic flavoproteins, characterization of *fixX*, and identification of *nifW*. *Mol. Gen. Genet.* **225**: 514-520.
- Asanuma, N., Ishiwata, M., Yoshii, T., Kikuchi, M., Nishina, Y., und Hino, T. (2005). Characterization and transcription of the genes involved in butyrate production in *Butyrovibrio fibrisolvens* type I and II strains. *Curr. Microbiol.* **47**: 203-207.
- Bache, R., und Pfennig, N. (1981). Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. *Arch. Microbiol.* **130**: 255-261.
- Bader, J., und Simon, H. (1980). The activities of hydrogenase and enoate reductase in two *Clostridium* species, their interrelationship and dependence on growth conditions. *Arch. Microbiol.* **127**: 279-287.
- Balch, W.E., Schoberth, S., Tanner, R.S., und Wolfe, R.S. (1977). *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **27**: 355-361.
- Banerjee, R., und Ragsdale, S.W. (2003). The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 209-247.
- Barondeau, D.P., und Lindahl, P.A. (1997). Methylation of carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum* and the mechanism of acetyl-CoA synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **119**: 3959 - 3970.
- Beattie, P., Tan, K., Bourne, R.M., Leach, D., Rich, P.R., und Ward, F.B. (1994). Cloning and sequencing of four structural genes for the Na<sup>+</sup>-translocating NADH-ubiquinone oxidoreductase of *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Letters* **356**: 333-338.
- Beaty, P.S., und Ljungdahl, L.G. (1990). Thiosulfate reduction by *Clostridium thermoaceticum* and *Clostridium thermoautotrophicum* during growth on methanol. *Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. Abstr.* **1-7**: 199.
- Beaty, P.S., und Ljungdahl, L.G. (1991). Growth of *Clostridium thermoaceticum* on methanol, ethanol or dimethylsulfoxide. *Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. Abstr.* **K-131**: 236.
- Bedzyk, L.A., Escudero, K.W., Gill, R.E., Griffin, K.J., und Frerman, F.E. (1993). Cloning, sequencing, and expression of the genes encoding subunits of *Paracoccus denitrificans* electron transfer flavoprotein. *J. Biol. Chem.* **268**: 20211-20217.
- Beechey, R.B., Roberton, A.M., Holloway, C.T., und Knight, I.G. (1967). The properties of dicyclohexylcarbodiimide as an inhibitor of oxidative phosphorylation. *Biochemistry* **6**: 3867-3879.
- Bertsova, Y.V., und Bogachev, A.V. (2004). The origin of the sodium-dependent NADH oxidation by the respiratory chain of *Kebsiella pneumoniae*. *FEBS Letters* **563**: 207-212.
- Bogachev, A.V., Murtazina, R.A., und Skulachev, V.P. (1996). H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry for NADH dehydrogenase I and dimethyl sulfoxide reductase in anaerobically grown *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **178**: 6233-6237.

- Boiangiu, C.D., Jayamani, E., Brügel, D., Herrmann, G., Kim, J., Forzi, L., Hedderich, R., Vgenopoulou, I., Pierik, A.J., Steuber, J., and Buckel, W. (2005). Sodium ion pumps and hydrogen production in glutamate fermenting anaerobic bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **10**:105-119.
- Bourne, R.M., und Rich, P.R. (1992). Characterization of a sodiummotive NADH:ubiquinone oxidoreductase. *Biochem. Soc. Trans.* **20**: 577-582.
- Boynton, Z.L., Bennett, G.N., und Rudolph, F.B. (1996). Cloning, sequencing, and expression of clustered genes encoding  $\beta$ -hydroxybutyryl-Coenzyme A (CoA) dehydrogenase, crotonase, and butyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* **178**: 3015-3024.
- Braun, K., und Gottschalk, G. (1981). Effect of molecular hydrogen and carbon dioxide on chemo-organotrophic growth of *Acetobacterium woodii* and *Clostridium aceticum*. *Arch. Microbiol.* **128**: 294-298.
- Brüggemann, H., Bäumer, S., Fricke, W.F., Wiezer, A., Liesegang, H., Decker, I., Herzberg, C., Martinez-Arias, R., Merkl, R., Henne, A., und Gottschalk, G. (2003). The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **100**: 1316-1321.
- Bryant, M.P. (1972). Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**: 1324-1328.
- Buchet, A., Eichler, K., und Mandrand-Berthelot, M.A. (1998). Regulation of the carnitine pathway in *Escherichia coli*: investigation of the *cai-fix* divergent promoter region. *J. Bacteriol.* **180**: 2599-2608.
- Bühler, M., Giesel, H., Tischer, W., und Simon, H. (1980). Occurrence and the possible physiological role of 2-enoate reductases. *FEBS Letters* **109**: 244-246.
- Caldeira, J., Feicht, R., White, H., Teixeira, M., Moura, J.J.G., Simon, H., und Moura, I. (1996). EPR and Mössbauer spectroscopic studies on enoate reductase. *J. Biol. Chem.* **271**: 18743-18748.
- Cecchini, G., Schröder, I., Gunsalus, R.P., und Maklashina, E. (2002). Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1553**: 140-157.
- Chen, D., und Swenson, R.P. (1994). Cloning, sequence analysis, and expression of the genes encoding the two subunits of the methylotrophic bacterium W3A1 electron transfer flavoprotein. *J. Biol. Chem.* **269**: 32120-32130.
- Claus, D., Fahmy, F., Rolf, H.J., und Tosunoglu, N. (1983). *Sporosarcina halophila* sp nov, an obligate, slightly halophilic bacterium from salt marsh soils. *System. Appl. Microbiol.* **4**: 496-506.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., und Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **69**: 2110-2114.
- Dangel, W., Schulz, H., Diekert, G., König, H., und Fuchs, G. (1987). Occurrence of corrinoid-containing membrane proteins in anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* **148**: 52-56.
- Darnault, C., Volbeda, A., Kim, E.J., Legrand, P., Vernede, X., Lindahl, P.A., und Fontecilla-Camps, J.C. (2003). Ni-Zn-[Fe<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>] and Ni-Ni-[Fe<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>] clusters in closed and open subunits of acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase. *Nat. Struct. Biol.* **10**: 271-279.
- Das, A., Hugenholtz, J., Van Halbeek, H., und Ljungdahl, L.G. (1989). Structure and function of a menaquinone involved in electron transport in membranes of *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **171**: 5823-5829.

- Das, A., und Ljungdahl, L.G. (2003). Electron-transport systems in acetogens. In: *Biochemistry and physiology of anaerobic bacteria*. Ljungdahl, L.G., Adams, M.W., Barton, L.L., Ferry, J.G. und Johnson, M.K. (eds). New York, Springer, pp. 191-204.
- Davidson, V.L., Husain, M., und Neher, J.W. (1986). Electron transfer flavoprotein from *Methylophilus methylotrophus*: properties, comparison with other electron transfer flavoproteins, and regulation of expression by carbon source. *J. Bacteriol.* **166**: 812-817.
- Dengl, S. (2004). Biochemische und molekularbiologische Analyse der Hydrogenasen in *Acetobacterium woodii*. Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Diekert, G., und Thauer, R.K. (1978). Carbon monoxide oxidation by *Clostridium thermoaceticum* and *Clostridium formicoaceticum*. *J. Bacteriol.* **136**: 597-606.
- Dorn, M., Andreesen, J.R., und Gottschalk, G. (1978a). Fermentation of fumarate and L-malate by *Clostridium formicoaceticum*. *J. Bacteriol.* **133**: 26-32.
- Dorn, M., Andreesen, J.R., und Gottschalk, G. (1978b). Fumarate reductase of *Clostridium formicoaceticum*. A peripheral membrane protein. *Arch. Microbiol.* **119**: 7-11.
- Doukov, T.I., Seravalli, J., Stezowski, J.J., und Ragsdale, S.W. (2002). Crystal structure of a methyltetrahydrofolate- and corrinoid-dependent methyltransferase. *Structure Fold. Des.* **8**: 817-830.
- Drake, H.L., Hu, S.I., und Wood, H.G. (1981). Purification of five components from *Clostridium thermoaceticum* which catalyze synthesis of acetate from pyruvate and methyltetrahydrofolate: Properties of phosphotransacetylase. *J. Biol. Chem.* **256**: 11137-11144.
- Drake, H.L., Küsel, K., und Matthies, C. (2004). Acetogenic Prokaryotes. In: *The Prokaryotes, 3rd Edition*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. und Stackebrandt, E. (eds). New York, Springer-Verlag.
- DuPlessis, E.R., Rohlfs, R.J., Hille, R., und Thorpe, C. (1994). Electron-transferring flavoprotein from pig and the methyltrophic bacterium W3A1 contain AMP as well as FAD. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **32**: 195-199.
- Earl, C.D., Ronson, C.W., und Ausubel, F.M. (1987). Genetic and structural analysis of the *Rhizobium melioli* *fix A*, *fix B*, *fix C*, and *fix X* genes. *J. Bacteriol.* **169**: 1127-1136.
- Eden, G., und Fuchs, G. (1982). Total synthesis of acetyl coenzyme A involved in autotrophic CO<sub>2</sub> fixation in *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* **133**: 66-74.
- Eichler, K., Buchet, A., Bourgis, F., Kleber, H.P., und Mandrand-Berthelot, M.A. (1995). The *fix Escherichia coli* region contains four genes related to carnitine metabolism. *J. Basic. Microbiol.* **35**: 217-227.
- Finocchiaro, G., Ito, M., Ikeda, Y., und Tanaka, K. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs encoding the alpha-subunit of human electron transfer flavoprotein. *J. Biol. Chem.* **263**: 15773-15780.
- Finocchiaro, G., Colombo, I., Garavaglia, B., Gellera, C., Valdameri, G., Garbuglio, N., und Didonato, S. (1993). cDNA cloning and mitochondrial import of the beta-subunit of the human electron transfer flavoprotein. *Eur. J. Biochem.* **213**: 1003-1008.
- Fischer, F., Lieske, R., und Winzer, K. (1932). Biologische Gasreaktionen. II. Über die Bildung von Essigsäure bei der biologischen Umsetzung von Kohlenoxyd und Kohlensäure zu Methan. *Biochem. Z.* **245**: 2-12.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., und *et al.* (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512.

- Fontaine, F.E., Peterson, W.H., McCoy, E., Johnson, M.J., und Ritter, G.J. (1942). A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum* n. sp. *J. Bacteriol.* **43**: 701-715.
- Frerman, F.E. (1987). Reaction of electron-transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase with the mitochondrial respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta* **893**: 161-169.
- Friedrich, T. (1998). The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**: 134-146.
- Fröstl, J.M., Seifritz, C., und Drake, H.L. (1996). Effect of nitrate on the autotrophic metabolism of the acetogens *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **178**: 4597-4603.
- Geerligs, G., Schönheit, P., und Diekert, G. (1989). Sodium dependent acetate formation from CO<sub>2</sub> in *Peptostreptococcus productus* (strain Marburg). *FEMS Microbiol. Lett.* **57**: 253-258.
- Gemperli, A.C., Dimroth, P., und Steuber, J. (2003). Sodium ion cycling mediates energy coupling between complex I and ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **100**: 839-844.
- Gottschalk, G., und Thauer, R.K. (2001). The Na<sup>+</sup>-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea. *Biochim. Biophys. Acta* **1505**: 28-36.
- Gottwald, M., Andreesen, J.R., LeGall, J., und Ljungdahl, L.G. (1975). Presence of cytochrome and menaquinone in *Clostridium formicoaceticum* and *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **122**: 325-328.
- Grahame, D.A. (2003). Acetate C-C bond formation and decomposition in the anaerobic world: the structure of a central enzyme and its key active-site metal cluster. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 221-224.
- Griffin, K.J., Dwyer, T.M., Manning, M.C., Meyer, J.D., Carpenter, J.F., und Frerman, F.E. (1997). alphaT244M mutation affects the redox, kinetic, and in vitro folding properties of *Paracoccus denitrificans* electron transfer flavoprotein. *Biochemistry* **36**: 4194-4202.
- Gross, R., Simon, J., und Kröger, A. (2001). Periplasmic methacrylat reductase activity in *Wolinella succinogenes*. *Arch. Microbiol.* **176**: 310-313.
- Gubler, M., und Hennecke, H. (1986). *fixA*, *B* and *C* genes are essential for symbiotic and free-living, microaerobic nitrogen fixation. *FEBS Letters* **200**: 186-192.
- Gubler, M., und Hennecke, H. (1988). Regulation of the *fixA* gene and *fixBC* operon in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **170**: 1205-1214.
- Hallenbeck, P.C., und Vignais, P.M. (1981). The effect of electron transport inhibitors on nitrogenase activity in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulatus*. *FEMS Microbiol Lett.* **12**: 15-18.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557 - 580.
- Hansen, B., Bokranz, M., Schönheit, P., und Kröger, A. (1988). ATP formation coupled to caffeate reduction by H<sub>2</sub> in *Acetobacterium woodii* NZva16. *Arch. Microbiol.* **150**: 447-451.
- Härtel, U., und Buckel, W. (1996). Sodium ion-dependent hydrogen production in *Acidaminococcus fermentans*. *Arch. Microbiol.* **166**: 350-356.
- Hayashi, M., und Unemoto, T. (1987). Subunit component and their roles in the sodium-transport NADH: quinone reductase of a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*. *Biochim. Biophys. Acta* **890**: 47-54.

- Hayashi, M., Miyoshi, T., Sato, M., und Unemoto, T. (1992). Properties of respiratory chain-linked  $\text{Na}^+$ -independent NADH-quinone reductase in a marine *Vibrio alginolyticus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1099**: 145-151.
- Hayashi, M., Hirai, K., und Unemoto, T. (1994). Cloning of the  $\text{Na}^+$ -translocating NADH-quinone reductase gene from the marine bacterium *Vibrio alginolyticus* and the expression of the beta-subunit in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **356**: 330-332.
- Heise, R., Müller, V., und Gottschalk, G. (1989). Sodium dependence of acetate formation by the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *J. Bacteriol.* **171**: 5473-5478.
- Heise, R. (1992). Energiekonservierung in *Acetobacterium woodii*: Aufbau einer elektrochemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten und Nutzung durch eine ATP-Synthase mit  $\text{Na}^+$  als Kopplungssion. Dissertation an der Georg-August-Universität Göttingen.
- Heise, R., Müller, V., und Gottschalk, G. (1992). Presence of a sodium-translocating ATPase in membrane vesicles of the homoacetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *Eur. J. Biochem.* **206**: 553-557.
- Hetzl, M., Brock, M., Selmer, T., Pierik, A.J., Golding, B.T., und Buckel, W. (2003). Acryloyl-CoA reductase from *Clostridium propionicum*. An enzyme complex of propionyl-CoA dehydrogenase and electron-transferring flavoprotein. *Eur. J. Biochem.* **270**: 902-910.
- Holmes, D.S., und Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
- Hu, S.I., Pezacka, E., und Wood, H.G. (1984). Acetate synthesis from carbon monoxide by *Clostridium thermoaceticum*. Purification of the corrinoid protein. *J. Biol. Chem.* **259**: 8892-8897.
- Hugenholtz, J., Ivey, D.M., und Ljungdahl, L.G. (1987). Carbon monoxide-driven electron transport in *Clostridium thermoautotrophicum* membranes. *J. Bacteriol.* **169**: 5845-5847.
- Hugenholtz, J., und Ljungdahl, L.G. (1989). Electron transport and electrochemical proton gradient in membrane vesicles of *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **171**: 2873-2875.
- Hugenholtz, J., und Ljungdahl, L.G. (1990). Metabolism and energy generation in Homoacetogenic Clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 383-389.
- Hungate, R.E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: *Methods in Microbiology*. Vol. 3b. Norris, J.R. und Ribbons, D.W. (eds). New York and London., Academic Press, pp. p 117-132.
- Imkamp, F., und Müller, V. (2002). Chemiosmotic energy conservation with  $\text{Na}^+$  as the coupling ion during hydrogen-dependent caffeate reduction by *Acetobacterium woodii*. *J. Bacteriol.* **184**: 1947-1951.
- Inoue, H., Nojima, H., und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Ivey, D.M., und Ljungdahl, L.G. (1986). Purification and characterization of the  $\text{F}_1$ -ATPase from *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **165**: 252-257.
- Jayamani, E., Boiangiu, C., Vgenopoulou, I., Steuber, J., Forzi, L., Hedderich, R., und Buckel, W. (2005). NADH dehydrogenase from *Clostridium tetanomorphum*: energy-driven electron transfer. Posterpräsentation, VAAM Jahrestagung 2005, Göttingen.
- Jormakka, M., Byrne, B., und Iwata, S. (2003). Protonmotive force generation by a redox loop mechanism. *FEBS Letters* **545**: 25-30.
- Jouanneau, Y., Jeong, H.S., Hugo, N., Meyer, C., und Willison, J.C. (1998). Overexpression in *Escherichia coli* of the *rnf* genes from *Rhodobacter capsulatus*-characterization of two membrane-bound iron-sulfur proteins. *Eur. J. Biochem.* **251**: 54-64.

- Kaminski, P.A., Norel, F., Desnoues, N., Kush, A., Salzano, G., und Elmerich, C. (1988). Characterization of the *fixABC* region of *Azorhizobium caulinodans* ORS 571 and identification of a new nitrogen fixation gene. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 496-502.
- Kengen, S.W., Mosterd, J.J., Nelissen, R.L.H., Keltjens, J.T., van der Drift, C., und Vogels, G.D. (1988). Reductive activation of the methyl-tetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain ΔH. *Arch. Microbiol.* **150**: 405-412.
- Kim, J., Hetzel, M., Boiangiu, C.D., und Buckel, W. (2004). Dehydration of (R)-2-hydroxyacyl-CoA to enoyl-CoA in the fermentation of alpha-amino acids by anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 455-468.
- Komuniecki, R., McCrury, J., Thissen, J., und Rubin, N. (1989). Electron-transfer flavoprotein from anaerobic *Ascaris suum* mitochondria and its role in NADH-dependent 2-methyl branched-chain enoyl-CoA reduction. *Biochim. Biophys. Acta* **975**: 127-131.
- Krebs, W., Steuber, J., Gemperli, A.C., und Dimroth, P. (1999). Na<sup>+</sup> translocation by the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Microb.* **33**: 590-598.
- Kröger, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Uden, G., und Lancaster, C.R. (2002). Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1553**: 23-38.
- Kumagai, H., Fujiwara, T., Matsubara, H., und Saeki, K. (1997). Membrane localization, topology, and mutual stabilization of the *rnfABC* gene products in *Rhodobacter capsulatus* and implications for a new family of energy-coupling NADH oxidoreductases. *Biochemistry* **36**: 5509-5521.
- Kuno, S., Bacher, A., und Simon, H. (1985). Structure of enoate reductase from a *Clostridium tyrobutyricum* (C. spec. La1). *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **366**: 463-472.
- Kurata, A., Kurihara, T., Kamachi, H., und Esaki, N. (2005). 2-Haloacrylate reductase, a novel enzyme of the medium chain dehydrogenase/reductase superfamily that catalyzes the reduction of a carbon-carbon double bond of unsaturated organohalogen compounds. *J. Biol. Chem.* **280**: 20286-20291.
- Lienard, T., Becher, B., Marschall, M., Bowien, S., und Gottschalk, G. (1996). Sodium ion translocation by N<sup>5</sup>-methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina mazei* Gö1 reconstituted in ether lipid liposomes. *Eur. J. Biochem.* **239**: 857-864.
- Lorowitz, W.H., und Bryant, M.P. (1984). *Peptostreptococcus productus* strain that grows rapidly with CO as the energy source. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 961-964.
- Lovell, C.R., Przybyla, A., und Ljungdahl, L.G. (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Clostridium thermoaceticum* gene encoding thermostable formyltetrahydrofolate synthetase. *Arch. Microbiol.* **149**: 280-285.
- Lovell, C.R., Przybyla, A., und Ljungdahl, L.G. (1990). Primary structure of the thermostable formyltetrahydrofolate synthetase from *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry* **29**: 5687-5694.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., und Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Masepohl, B., und Klipp, W. (1996). Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. *Arch. Microbiol.* **165**: 80-90.

- Matthies, C., Freiberger, A., und Drake, H.L. (1993). Fumarate dissimilation and differential reductant flow by *Costridium formicoaceticum* and *Clostridium aceticum*. *Arch. Microbiol.* **160**: 273-278.
- Mayhew, G.F., und Massey, V. (1971). Evidence for a novel flavin prosthetic group associated with NADH dehydrogenase from *Peptostreptococcus elsdenii*. *Biochim. Biophys. Acta* **235**: 303-310.
- Mikoulinskaia, O., Akimenko, A., Galouchko, A., Thauer, R.K., und Hedderich, R. (1999). Cytochrome c-dependent methacrylate reductase from *Geobacter sulfurreducens* AM-1. *Eur. J. Biochem.* **263**: 346-352.
- Misoph, M., Daniel, S.L., und Drake, H.L. (1996). Bidirectional usage of ferulate by the acetogen *Peptostreptococcus productus* U-1: CO<sub>2</sub> and aromatic acrylate groups as competing electron accepters. *Microbiology (UK)* **142**: 1983-1988.
- Möller, B., Oßmer, R., Howard, B.H., Gottschalk, G., und Hippe, H. (1984). *Sporomusa*, a new genus of gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov and *Sporomusa ovata* spec. nov. *Arch. Microbiol.* **139**: 388-396.
- Müller, V., Blaut, M., und Gottschalk, G. (1988). The transmembrane electrochemical gradient of Na<sup>+</sup> as driving force for methanol oxidation in *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **172**: 601-606.
- Müller, V., Blaut, M., und Gottschalk, G. (1993). Bioenergetics of methanogenesis. In: *Methanogenesis*. Ferry, J.G. (ed). New York, NY, Chapman & Hall, pp. 360-406.
- Müller, V., und Gottschalk, G. (1994). The sodium ion cycle in acetogenic and methanogenic bacteria: generation and utilization of a primary electrochemical sodium ion gradient. In: *Acetogenesis*. Drake, H.L. (ed). New York, Chapman & Hall, pp. 127-156.
- Müller, V., Imkamp, F., Rauwolf, A., Küsel, K., und Drake, H.L. (2004). Molecular and cellular biology of acetogenic bacteria. In: *Strict and facultative anaerobes. Medical and environmental aspects*. Nakano, M.M. and Zuber, P. (eds), Horizon Bioscience, Norfolk, pp. 251-281.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Nakayama, Y., Hayashi, M., und Unemoto, T. (1998). Identification of six subunits constituting Na<sup>+</sup>-translocating NADH-quinone reductase from the marine *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Letters* **422**: 240-242.
- Nakayama, Y., Hayashi, M., Yoshikawa, K., Mochida, K., und Unemoto, T. (1999). Inhibitor studies of a new antibiotic, korormicin, 2-n-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide and Ag<sup>+</sup> toward the Na<sup>+</sup>-translocating NADH-quinone reductase from the marine *Vibrio alginolyticus*. *Biol. Pharm. Bull.* **22**: 1064-1067.
- Nakayama, Y., Yasui, M., Sugahara, K., Hayashi, M., und Unemoto, T. (2000). Covalently bound flavin in the NqrB and NqrC subunits of Na<sup>+</sup>-translocating NADH-quinone reductase from *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Letters* **474**: 165-168.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
- O'Neill, H., Mayhew, S.G., und Butler, G. (1998). Cloning and analysis of the genes for a novel electron-transferring flavoprotein from *Megasphaera elsdenii*. Expression and characterization of the recombinant protein. *J. Biol. Chem.* **273**: 21015-21024.
- O'Neill, H., Mayhew, S.G., und Butler, G. (1998). Cloning and analysis of the genes for a novel electron-transferring flavoprotein from *Megasphaera elsdenii*. *J. Biol. Chem.* **273**: 21015-21024.

- Parke, D., und Ornston, L.N. (2003). Toxicity caused by hydroxycinnamoyl-coenzyme A thioester accumulation in mutants of *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Appl. Environ. Microbiol* **70**: 2974-2983.
- Peferoen, M., Huybrechts, R., und de Loof, A. (1982). Vacuum blotting: a new simple and efficient transfer of proteins from sodium dodecylsulfat polyacrylamid gels to nitrocellulose. *FEBS Letters* **145**: 369-372.
- Perski, H.J., Moll, J., und Thauer, R.K. (1981). Sodium dependence of growth and methane formation in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* **130**: 319-321.
- Perski, H.J., Schönheit, P., und Thauer, R.K. (1982). Sodium dependence of methane formation in methanogenic bacteria. *FEBS Letters* **143**: 323-326.
- Pezacka, E., und Wood, H.G. (1984a). Role of carbon monoxide dehydrogenase in the autotrophic pathway used by acetogenic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 6261-6265.
- Pezacka, E., und Wood, H.G. (1984b). The synthesis of acetyl-CoA by *Clostridium thermoaceticum* from carbon dioxide, hydrogen, coenzym A and methyltetrahydrofolate. *Arch. Microbiol* **137**: 63-69.
- Pfenninger-Li, X.D., und Dimroth, P. (1995). The Na<sup>+</sup>-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase from the marine bacterium *Vibrio alginolyticus* contains FAD but not FMN. *FEBS Letters* **369**: 173-176.
- Ragsdale, S.W., Ljungdahl, L.G., und DerVartanian, D.V. (1983). Isolation of carbon monoxide dehydrogenase from *Acetobacterium woodii* and comparison of its properties with those of the *Clostridium thermoaceticum* enzyme. *J. Bacteriol.* **155**: 1224-1237.
- Ragsdale, S.W., und Ljungdahl, L.G. (1984). Hydrogenase from *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* **139**: 361-365.
- Ragsdale, S.W., Lindahl, P.A., und Münck, E. (1987). Mössbauer, EPR, and optical studies of the corrinoid/iron-sulfur protein involved in the synthesis of acetyl-coenzyme A by *Clostridium thermoaceticum*. *J. Biol. Chem.* **26**: 1489-14297.
- Ragsdale, S.W. (1991). Enzymology of the acetyl-CoA pathway of autotrophic CO<sub>2</sub> fixation. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**: 261-300.
- Ragsdale, S.W., und Kumar, M. (1996). Nickel-containing carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-Coa synthase. *Chem. Rev.* **96**: 2515-2539.
- Rahlfs, S. (1998). Klonierung und molekularbiologische Analyse der Gene der Na<sup>+</sup>-translozierenden F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase aus *Acetobacterium woodii*. Dissertation an der Georg-August-Universität, Göttingen.
- Raybuck, S.A., Bastian, N.R., Orme-Johnson, W.H., und Walsh, C.T. (1988). Kinetic characterization of the carbon monoxide-acetyl-CoA (carbonyl group) exchange activity of the acetyl-CoA synthesizing CO dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry* **27**: 7698-7702.
- Richardson, D.J., Berks, B.C., Russell, D.A., Spiro, S., und Taylor, C.J. (2001). Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cell Mol. Life Sci.* **58**: 379-385.
- Roberts, D.L., James-Hagstrom, J.E., Garvin, D.K., Gorst, C.M., Runquist, J.A., Baur, J.R., Haase, F.C., und Ragsdale, S.W. (1989). Cloning and expression of the gene cluster encoding key proteins involved in acetyl-CoA synthesis in *Clostridium thermoaceticum*: CO dehydrogenase, the corrinoid/Fe-S protein, and methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 32-36.

- Roberts, D.L., Herrick, K.R., Frerman, F.E., und Kim, J.J. (1995). Crystallization and preliminary X-ray analysis of electron transfer flavoproteins from human and *Paracoccus denitrificans*. *Protein Sci.* **4**: 1654-1657.
- Roberts, D.L., Frerman, F.E., und Kim, J.J. (1996). Three-dimensional structure of human electron transfer flavoprotein to 2.1-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**: 14355-14360.
- Roberts, D.L., Salazar, D., Fulmer, J.P., Frerman, F.E., und Kim, J.J. (1999). Crystal structure of *Paracoccus denitrificans* electron transfer flavoprotein: structural and electrostatic analysis of a conserved flavin binding domain. *Biochemistry* **38**: 1977-1989.
- Rohdich, F., Wiese, A., Feicht, R., Simon, H., und Bacher, A. (2001). Enoate reductases of Clostridia. Cloning, sequencing, and expression. *J. Biol. Chem.* **276**: 5779-5787.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato, K., Nishina, Y., und Shiga, K. (1993). Electron-transferring flavoprotein has an AMP-binding site in addition to the FAD-binding site. *J. Biochem (Tokyo)* **114**: 215-222.
- Schägger, H., und von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
- Schaupp, A., und Ljungdahl, L.G. (1974). Purification and properties of acetate kinase from *Clostridium thermoaceticum*. *Arch. Microbiol.* **100**: 121-129.
- Scherer, P.A., und Thauer, R.K. (1978). Purification and properties of reduced ferredoxin: CO<sub>2</sub> oxidoreductase from *Clostridium pasteurianum*, a molybdenum iron-sulfur-protein. *Eur. J. Biochem.* **85**: 125-135.
- Schmehl, M., Jahn, A., Meyer zu Vilsendorf, A., Hennecke, S., Masepohl, B., Schuppler, M., Marxer, M., Oelze, J., und Klipp, W. (1993). Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*: a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 602-615.
- Schmidt, G.W., Matlin, K.S., und Chua, N.-H. (1977). A rapid procedure for selective enrichment of photosynthetic electron transport mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **74**: 610-614.
- Schmidt, K., Liaanen-Jensen, S., und Schlegel, H.G. (1963). Die Carotinoide der *Thiorodaceae*. *Arch. Mikrobiol.* **46**: 117-126.
- Schönheit, P., Wäscher, C., und Thauer, R.K. (1978). A rapid procedure for the purification of ferredoxin from Clostridia using polyethylenimine. *FEBS Letters* **89**: 219-222.
- Scott, J.D., und Ludwig, R.A. (2004). *Azorhizobium caulinodans* electron-transferring flavoprotein N electrochemically couples pyruvate dehydrogenase complex activity to N<sub>2</sub> fixation. *Microbiology* **150**: 117-126.
- Seifritz, C., Daniel, S.L., Gossner, A., und Drake, H.L. (1993). Nitrate as a preferred electron sink for the acetogen *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **175**: 8008-8013.
- Seifritz, C., Drake, H.L., und Daniel, S.L. (2003). Nitrite as an energy-conserving electron sink for the acetogenic bacterium *Moorella thermoacetica*. *Curr. Microbiol.* **46**: 329-333.
- Seravalli, J., Kumar, M., Lu, W.P., und Ragsdale, S.W. (1997). Mechanism of carbon monoxide oxidation by the carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase from *Clostridium thermoaceticum*: kinetic characterization of the intermediates. *Biochemistry* **36**: 11241-11251.
- Seravalli, J., Shoemaker, R.K., Sudbeck, M.J., und Ragsdale, S.W. (1999a). Binding of (6R,S)-methyltetrahydrofolate to methyltransferase from *Clostridium thermoaceticum*: role of protonation of methyltetrahydrofolate in the mechanism of methyl transfer. *Biochemistry* **38**: 5736-5745.

- Seravalli, J., Zhao, S., und Ragsdale, S.W. (1999b). Mechanism of transfer of the methyl group from (6S)-methyltetrahydrofolate to the corrinoid/iron-sulfur protein catalyzed by the methyltransferase from *Clostridium thermoaceticum*: a key step in the Wood-Ljungdahl pathway of acetyl-CoA synthesis. *Biochemistry* **38**: 5728-5735.
- Sharkey, C.T., Walsh, M.A., Mayhew, S.G., und Higgins, T.M. (1997). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the electron-transferring flavoprotein from *Megasphaera elsdenii*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **53**: 461-463.
- Simon, H. (1991). Enoate Reductase. In: *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes Vol. II*. Müller, F. (ed). Boca Raton, Fla., CRC Press, Inc., pp. 317-328.
- Simon, J., Gross, R., Klimmek, O., Ringel, M., und Kröger, A. (1998). A periplasmic flavoprotein in *Wolinella succinogenes* that resembles the fumarate reductase of *Shewanella putrefaciens*. *Arch. Microbiol* **169**: 424-433.
- Simon, J. (2002). Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 285-309.
- Soboh, B., Linder, D., und Hedderich, R. (2004). A multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenase and an NADH-dependent Fe-only hydrogenase in the fermenting bacterium *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Microbiology* **150**: 2451-2463.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Steenkamp, D.J., und Mallinson, J. (1976). Trimethylamine dehydrogenase from a methylotrophic bacterium. I. isolation and steady state kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* **429**: 705-719.
- Steuber, J., Krebs, W., und Dimroth, P. (1997). The Na<sup>+</sup>-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Vibrio alginolyticus* - redox states of the FAD prosthetic group and mechanism of Ag<sup>+</sup> inhibition. *Eur. J. Biochem.* **249**: 770-776.
- Stolpe, S., und Friedrich, T. (2004). The *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) is a primary proton pump but may be capable of secondary sodium antiport. *J. Biol. Chem* **279**: 18377-18383.
- Stupperich, E., und Konle, R. (1993). Corrinoid-dependent methyl transfer reactions are involved in methanol and 3,4-dimethoxybenzoate metabolism by *Sporomusa ovata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3110-3116.
- Szeto, W.W., Zimmermann, J.L., Sundaresan, V., und Ausubel, F.M. (1984). A *Rhizobium melioli* symbiotic regulatory gene. *Cell* **36**: 1035-1043.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., und Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **41**: 100-180.
- Thorpe, C. (1991). Electron Transferring Flavoproteins. In: *The Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes II*. Müller, F. (ed). Boca Raton, Fla., CRC Press, pp. 471-486.
- Tokuda, H., und Unemoto, T. (1981). A respiration-dependent primary sodium extrusion system functioning at alkaline pH in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102**: 265-271.
- Tsai, M.H., und Saier Jr., M.H. (1995). Phylogenetic characterization of the ubiquitous electron transfer flavoprotein families ETF-alpha and ETF-beta. *Res. Microbiol.* **146**: 397-404.
- Tschech, A., und Pfennig, N. (1984). Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* **137**: 163-167.
- Unemoto, T., Hayashi, M., und Hayashi, M. (1977). Na<sup>+</sup>-dependent activation of NADH oxidase in membrane fractions from halophilic *Vibrio alginolyticus* and *V. costicolus*. *J. Biochem (Tokyo)* **82**: 1389-1395.

- Unemoto, T., Ogura, T., und Hayashi, M. (1993). Modifications by Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, and the site of Ag<sup>+</sup> inhibition in the Na<sup>+</sup>-Translocating NADH-Quinone reductase from a marine *Vibrio alginolyticus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1183**: 201-205.
- van de Wijngaard, W.M.H., Lugtigheid, R.L., und van der Drift, C. (1991). Reductive activation of the corrinoid-containing enzyme involved in methyl group transfer between methyl-tetrahydromethanopterin and coenzyme M in *Methanosarcina barkeri*. *Anton Leeuwenhoek Int. J. Gen. M.* **60**: 1-6.
- Walt, A., und Kahn, M.L. (2002). The *fixA* and *fixB* genes are necessary for anaerobic carnitin reduction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**: 4044-4047.
- Weber, K., und Osborne, M. (1969). The reliability of the molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.
- Weidenhaupt, M., Rossi, P., Beck, C., Fischer, H.M., und Hennecke, H. (1996). *Bradyrhizobium japonicum* possesses two discrete sets of electron transfer flavoprotein genes: *fixA*, *fixB* and *etfS*, *etfL*. *Arch. Microbiol.* **165**: 169-178.
- Whitfield, C.D., und Mayhew, S.G. (1974). Purification and properties of electron-transferring flavoprotein from *Peptostreptococcus elsdenii*. *J. Biol. Chem.* **249**: 2801-2810.
- Wiegel, J., Braun, M., und Gottschalk, G. (1981). *Clostridium thermoautotrophicum* species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Curr. Microbiol.* **5**: 255-260.
- Wierenga, R.K., de Maeyer, M.C.H., und Hol, W.G.J. (1985). Interaction of pyrophosphate moieties with  $\alpha$ -helices in dinucleotide binding proteins. *Biochemistry* **24**: 1346-1357.
- Wieringa, K.T. (1939-1940). The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic spore-forming bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **6**: 251-262.
- Wirt, M.D., Kumar, M., Wu, J.J., Scheuring, E.M., Ragsdale, S.W., und Chance, M.R. (1995). Structural and electronic factors in heterolytic cleavage: formation of the Co(I) intermediate in the corrinoid/iron-sulfur protein from *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry* **34**: 5269-5273.
- Wohlfarth, G., Geerligs, G., und Diekert, G. (1990). Purification and properties of a NADH-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase from *Peptostreptococcus productus*. *Eur. J. Biochem.* **192**: 411-417.
- Wohlfarth, G., und Diekert, G. (1991). Thermodynamics of methylenetetrahydrofolate reduction to methyltetrahydrofolate and its implications for the energy metabolism of homoacetogenic bacteria. *Arch. Microbiol.* **155**: 378-381.
- Yagi, T., Yano, T., Di Bernardo, S., und Matsuno-Yagi, A. (1998). Procaryotic complex I (NDH-1), an overview. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**: 125-133.
- Yamamoto, I., Saiki, T., Liu, S.M., und Ljungdahl, L.G. (1983). Purification and properties of NADP-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*, a tungsten-selenium-iron protein. *J. Biol. Chem.* **258**: 1826-1832.
- Yang, H., und Drake, H.L. (1990). Differential effects of sodium on hydrogen- and glucose-dependent growth of the acetogenic bacterium *Acetogenium kivui*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 81-86.
- Yang, S.S., Ljungdahl, L.G., DerVartanian, D.V., und Watt, G.D. (1980). Isolation of two rubredoxins from *Clostridium thermoaceticum*. *Biochim. Biophys. Acta* **590**: 24-33.
- Yoshikawa, K., Takadera, T., Adachi, K., Nishijima, M., und Sano, H. (1997). Korormicin, a novel antibiotic specifically active against marine gram-negative bacteria, produced by a marine bacterium. *J. Antibiot. (Tokyo)* **50**: 949-953.

- Yoshikawa, K., Nakayama, Y., Hayashi, M., Unemoto, T., und Mochida, K. (1999). Korormicin, an antibiotic specific for gram-negative marine bacteria, strongly inhibits the respiratory chain-linked Na<sup>+</sup>-translocating NADH: quinone reductase from the marine *Vibrio alginolyticus*. *J Antibiot. (Tokyo)* **52**: 182-185.
- Zhou, W., Bertsova, Y.V., Feng, B., Tsatsos, P., Verkhovskaya, M.L., Gennis, R.B., Bogachev, A.V., und Barquera, B. (1999). Sequencing and preliminary characterization of the Na<sup>+</sup>-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Vibrio harveyi*. *Biochemistry* **38**: 16246-16252.

## Anhang

Dargestellt ist die vollständige Nukleotidsequenz des 1713 Bp-großen *etfB-etfA*-Fragments sowie die davon abgeleitete Aminosäuresequenz (vgl. hierzu Experimente und Ergebnisse 2.2).

```

etfB →
1  ATG GGG GCG GAC GAA GCG TAT TTA TTA AGT GAT CGC GCT TTT GGT GGC GCC GAT
   M  G  A  D  E  A  Y  L  L  S  D  R  A  F  G  G  A  D
55  ACC TGG GCA ACC TCT GCA ACC TTG GCA GCC GGG ATT AAA AAA GTT AAA AAA GTA
   T  W  A  T  S  A  T  L  A  A  G  I  K  K  V  K  K  V
109  GAT CTG GTA TTA GCG GGA AGA CAG GCT ATC GAT GGC GAT ACC GCT CAA GTT GGA
   D  L  V  L  A  G  R  Q  A  I  D  G  D  T  A  Q  V  G
163  TCA CAG ATT GCG CAA CGG TTA AAA ATG CCA GTT GTT ACC TAT GTT GAA GAT ATT
   S  Q  I  A  Q  R  L  K  M  P  V  V  T  Y  V  E  D  I
217  AAA ATT GAA GAT AAA AAA GCG ATT GTT CAT CGA CAA ATG GAA GAC GGT TAT GAA
   K  I  E  D  K  K  A  I  V  H  R  Q  M  E  D  G  Y  E
271  GTT ATT GAA GTT CAG CTG CCT TGT TTG TTA ACT TGT GTG AAA GAA TTG AAT GAC
   V  I  E  V  Q  L  P  C  L  L  T  C  V  K  E  L  N  D
325  CCA CGA TAT ATG AGT GTT GGA GGT ATC ATG GAT GCC TAT GAA CAA CCG ATT ACG
   P  R  Y  M  S  V  G  G  I  M  D  A  Y  E  Q  P  I  T
379  ATA TGG AAT CAT GAA GAT ATT GGG TTG TCA CCA GAA GCT TGC GGT TTA AAT GCA
   I  W  N  H  E  D  I  G  L  S  P  E  A  C  G  L  N  A
433  TCG CCT ACT CAG GTA TTC CGT TCG TTC TCA CCA CCA GCT AAA GGT GGT GGT GAA
   S  P  T  Q  V  F  R  S  F  S  P  P  A  K  G  G  G  E
487  ATG ATT ACC GGG ACC ACC GTT AAT GAA GTT GCT GGC AGC CTG GTT TCA AAG CTT
   M  I  T  G  T  T  V  N  E  V  A  G  S  L  V  S  K  L
                                     STOP
541  AAA GAA AAG CAT ATA ATT TAG AAA GGA CAA ATA AAA ATG GCA ATT AAA GTT ATC
   K  E  K  H  I  I  -  K  G  Q  I  K  M  A  I  K  V  I
                                     etfA →
595  GAA GAA AAA TGT ATC GGA TGT TCA AAA TGT CAG AAA AGC TGT CCT TTT GAT GCC
   E  E  K  C  I  G  C  S  K  C  Q  K  S  C  P  F  D  A
649  ATC ACG ATT GAA AAT AAA ATA GCG GTT ATT GGT GAC GCA TGT ACA AAC TGT GGA
   I  T  I  E  N  K  I  A  V  I  G  D  A  C  T  N  C  G
703  ACC TGT ATT GAT GTT TGT CCG ACG GAA GCC ATT CTT CAG GAA GGC ACC GAA AAA
   T  C  I  D  V  C  P  T  E  A  I  L  Q  E  G  T  E  K
757  ATT GTT CGC GAC TTG AGC ATG TAC AAA GGT GTT TGG GTT TTT GCA GAA CAG CGT
   I  V  R  D  L  S  M  Y  K  G  V  W  V  F  A  E  Q  R
811  GAA GGA AAA ATT ATG CCG GTT GTT TTC GAA CTG CTG GGT GAA GGT AAA AAG TTG
   E  G  K  I  M  P  V  V  F  E  L  L  G  E  G  K  K  L
865  GCC AAT GAA ATT GGC ACG GAG CTA TGT GCG ATT CTT TGC GGT AGT AAT GTC GCT
   A  N  E  I  G  T  E  L  C  A  I  L  C  G  S  N  V  A
919  GAA CTT ACC GAT GAG TTG TTT GCC TAT GGT GCC GAT AAA GTG TAT CTT GCG GAT
   E  L  T  D  E  L  F  A  Y  G  A  D  K  V  Y  L  A  D

```

973 GCA CCC GAA CTT GAA AAA TAC ACG ACC GAT GGT TAT TCC AAA ATC ATC AAC GAA  
A P E L E K Y T T D G Y S K I I N E

1027 GCC ATT GGT TTA TAC AAA CCG GAA ATT GTT TTA TAT GGT GCA ACT CAT ATT GGT  
A I G L Y K P E I V L Y G A T H I G

1081 CGC GAC CTG GCG CCT TGC CTG GCC GTC AAA GTC AAC ACC GGT TTA ACA GCA GAC  
R D L A P C L A V K V N T G L T A D

1135 TGT ACC AAA CTG GAA ATT GAC CCT GAC GAT AAA AAA ATT AGA CAA ACG CGA CCG  
C T K L E I D P D D K K I R Q T R P

1189 GCC TTT GGC GGA AAT CTG ATG GCA ACA ATT GTT TGC CCG GGA AGC CGT CCG CAG  
A F G G N L M A T I V C P G S R P Q

1243 ATG TCA ACA GTC AGA CCT GGG GTT ATG GAT AAA GCA GCC TAT GAT CCA TCT CAA  
M S T V R P G V M D K A A Y D P S Q

1297 AAA GGT GAA GTC ATT AAA CTG GAC GCT ACC TTT AAT GAA GGT GAT ATC CGA ACT  
K G E V I K L D A T F N E G D I R T

1351 AAA GTT TTA GAA ATT GTT AAA ACA ACA ACG GAT AAT ATT TCA ATT TCT GAT GCT  
K V L E I V K T T T D N I S I S D A

1405 GAT TTC ATC GTA TCC GGC GGA ATG GGA CTT GGA AAA CCG GAA GGT TTT GAG CTG  
D F I V S G G M G L G K P E G F E L

1459 CTT AAG CAA CTT GCT GAT AAA CTG GGT GGA ACC GTA GCT ACA TCA AGA GCC TGC  
L K Q L A D K L G G T V A T S R A C

1513 GTG GAT GCC GGA TGG GCG GAC CAT GCC CAA CAA GTA GGT CAA ACC GGG ACA ACG  
V D A G W A D H A Q Q V G Q T G T T

1567 GTT AAA CCG CAG ATT TAT TTT GCT TGT GGA ATT TCG GGA GCA ATT CAG CAT ATT  
V K P Q I Y F A C G I S G A I Q H I

1621 GCC GGG ATG CAA GAT TCA GAC ATC ATC ATT GCG ATT AAC AAA AAT GAA AAC GCC  
A G M Q D S D I I I A I N K N E N A

1675 CCT ATT TTT GAA GTG GCC GAT TAC GGT ATC GTA GGC GAC  
P I F E V A D Y G I V G D

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Volker Müller für die Überlassung dieses interessanten Themas, sein Interesse am Fortgang der Arbeit, die Bereitschaft zu stimulierenden Diskussionen und für die fortwährende Unterstützung, die es mir u. a. auch ermöglichte an nationalen und internationalen Tagungen teilzunehmen.

Allen ehemaligen Mitgliedern des „alten“ Müller-Labors in München möchte ich für die wirklich lustige Zeit und die teils (wahn)witzige, wie inspirierende Atmosphäre herzlich danken, die das eine oder andere wissenschaftliche Tief erträglicher machte. Großen Anteil daran hatte vor allem Stefan und unser gemeinsamer Freund, der Eberhardt.

Für ihre Anregungen, Verwünschungen, Kritik, Lob und wertvollen Ratschläge möchte ich mich auch ganz herzlich bei den Frankfurter Kollegen des „neuen“ Müller-Labors, der AG Averhoff und der AG Rother bedanken, die mir den Laboralltag fern der bayerischen Heimat angenehm und kurzweilig machten.

Für tatkräftige Unterstützung des Projektes „Caffeatreduktion“ möchte ich mich bei Bernhard Granvogel, Oliver Schürmann, Sabrina Dilling, Lars Dvorak, Silke Schmidt und Elamparithi Jayamani bedanken.

Meinen „spanischen“ Freunden Ben und Kathi möchte ich nicht zuletzt für die zahlreichen unvergesslichen Abende bei Wein und rohem Fisch danken. Meinem alten Spezl Flo sei für den gewährten Unterschlupf und die heiteren Stunden in unserer kleinen „WG“ gedankt.

Ein ganz besonders großer Dank geht an meine Mutter, Sebastian und Anna deren liebevolle Unterstützung und Geduld maßgeblich zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben.

## Lebenslauf

Name: Frank Imkamp  
Geburtsort: Donaueschingen  
Geburtsdatum: 19.11.1974

1981 – 1984: Besuch der Grundschule Aising/Rosenheim  
1984 – 1993: Besuch des Finsterwalder-Gymnasiums, Rosenheim  
Mai 1993: Abitur  
Mai 1993 – November 1993: Angestellter des „Franz Lechner Catering Service“  
Dezember 1993 – Februar 1995: Zivildienst in der Jugendherberge Traunstein  
Mai 1995 – November 1995: Studium am Soziologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München  
November 1995: Beginn des Studiums an der Biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
November 1997: Vordiplom  
September 2000: Diplom-Prüfung in den Fächern Mikrobiologie, medizinische Mikrobiologie, Biochemie, Zellbiologie  
Dezember 2000 – August 2001: Diplomarbeit bei Prof. Dr. Volker Müller am Lehrstuhl für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München; Titel: Chemiosmotische Energiekonservierung mit Na<sup>+</sup> als Kopplungssion im Zuge der H<sub>2</sub>-abhängigen Caffeatreduktion in *Acetobacterium woodii*.  
Dezember 2001: Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation  
Februar 2004: Umzug an das Institut für Molekulare Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main