

Untersuchungen zum Stoffwechsel des anaeroben Alkanabbaus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

Dem Fachbereich Biologie / Chemie der
Universität Bremen vorgelegt von

Insa Werner
aus Oldenburg (Oldb)

Bremen 2009

Die Untersuchungen zu der vorliegenden Doktorarbeit wurden von September 2004 bis September 2008 am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Friedrich Widdel
2. Gutachter: PD Dr. Jens Harder

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
A Zusammenfassung.....	1
B Einleitung	3
1. Vorkommen und Eigenschaften von Kohlenwasserstoffen	3
2. Abbau von Kohlenwasserstoffen.....	4
2.1. Aerober Abbau von Alkanen	5
2.2. Anaerober Abbau von Aromaten.....	6
2.3. Anaerober Abbau von Alkanen	7
3. Radikalenzyme als Katalysatoren biologischer Reaktionen.....	9
3.1. Anaerober Abbau von Toluol	10
3.2. Anaerober Abbau von Hexan in Stamm HxN1.....	11
3.3. Aktivierung und Reaktion der Methylalkylsuccinat-Synthase	14
C Material und Methoden	16
1. Chemikalien, Gase und Enzyme	16
2. Mikrobiologische Methoden	16
2.1. Organismen.....	16
2.2. Nährmedien.....	17
2.2.1. Anerobes Medium zur Anzucht von Stamm HxN1 und Stamm OcN1	17
2.2.2. Anaerobes Medium zur Anzucht von <i>Desulfothermus naphthae</i> (Stamm TD3)	21
2.2.3. Anaerobes Medium zur Anzucht von <i>Desulfatibacillum</i> sp. (Stamm Pnd3).....	22
2.2.4. Aerobes Medium zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	23
2.3. Anzucht der Zellen	24
2.3.1. Zellanzucht der anaeroben <i>n</i> -Alkanabbauer	24
2.3.2. Zellanzucht von <i>Escherichia coli</i>	25
2.4. Zellernte von Alkanabbauern unter anoxischen Bedingungen.....	25
2.4.1. Kontinuierliche Ernte	25
2.4.2. Diskontinuierliche Ernte.....	25
2.5. Herstellung von Zellextrakten.....	26
3. Molekularbiologische Methoden.....	27

3.1. Vektoren und Primer	27
3.2. Plasmidkonstrukte zur heterologen Expression	29
3.3. DNA-Isolierung	30
3.3.1. Isolierung von chromosomaler DNA.....	30
3.3.2. Isolierung von Plasmid DNA.....	31
3.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
3.5. Reinigung und Sequenzierung von PCR-Produkten	32
3.5.1. Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden	32
3.5.2. Sequenzierung von Fosmid Klonen	33
3.6. Restriktion	34
3.7. Ligation von Plasmid- und Insert-DNA	34
3.8. Transformation von <i>Escherichia coli</i>	35
3.8.1. Klonierung- und Transformation mittels TA-Klonierung	35
3.9. Erstellen von Fosmid-Bibliotheken	36
3.10. Koloniehybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden	36
4. Biochemische Methoden	38
4.1. Überexpression in <i>Escherichia coli</i>	38
4.2. Reinigung rekombinanter Proteine.....	38
4.2.1. GST-Affinitätschromatographie	38
4.2.2. Strep-Tactin-Affinitätschromatographie.....	39
4.3. Gewinnung von Antikörpern	39
4.4. Proteinbestimmung nach Bradford.....	40
4.5. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
4.6. Identifizierung von Proteinen über Peptidmassen-Fingerprint (PMFP).....	41
4.7. Tricin-PAGE	42
4.8. Acetonfällung von Proteinen	42
4.9. Western-Blot	42
4.10. Bestimmung der Methylalkylsuccinat-Synthase-Aktivität	46
4.10.1. Enzymtest.....	46
4.10.2. Identifikation von 1-Methylpentylsuccinat mittels Gaschromatographie- Massenspektrometrie (GC-MS).....	46
4.11. Bestimmung von Nitrat und Nitrit mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	48
4.12. Reinigung der Methylalkylsuccinat-Synthase von Stamm HxN1.....	49
4.12.1. Ionenaustauschchromatographie an ANX-Sepharose.....	49

4.12.2. Gelfiltration an Sephadex G 25 zum Umpuffern	50
4.12.3. Hydroxylapatit-Chromatographie.....	50
4.12.4. Gelfiltration an Superdex 200 zur Molekularmassebestimmung des nativen Enzyms	50
D Ergebnisse	52
1. Heterologe Überexpression in <i>Escherichia coli</i>	52
1.1. Überexpression der α -, β - und γ -Untereinheit	53
1.1.1. Herstellung der Antikörper.....	55
1.2. Überexpression des MasCDE-Konstruktes und der Aktivase (MasG).....	56
1.2.1. Aktivase	57
1.2.2. Methylalkylsuccinat-Synthase (MasCDE)	58
2. Identifikation von <i>mas</i> -Genen in <i>n</i> -Alkan verwertenden Anaerobiern	61
2.1. Stamm OcN1.....	61
2.2. <i>Desulfothermus naphthae</i> (TD3) und <i>Desulfatibacillum</i> sp. (Pnd3)	65
3. Vergleich der α -Untereinheiten von OcN1, Pnd3 und TD3 mit bekannten großen Untereinheiten von Glycyl-Radikal Enzymen (GRE).....	67
4. Vergleich der Aktivase von OcN1 mit anderen SAM Enzymen.....	71
5. Unterscheidung von Alkan- und Aromatenabbauern mittels PCR	74
6. Entwicklung und Validierung eines Aktivitätstests für die Methylalkylsuccinat-Synthase von Stamm HxN1	76
6.1. Einfluss von Nitrit auf die gemessene Enzymaktivität im Rohextrakt.....	81
6.2. Einfluss von NO auf die Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase.....	83
6.3. Optimierung der Aktivitätstest-Bedingungen im Rohextrakt.....	85
6.3.1. Bestimmung der optimalen Fumarat-Konzentration.....	85
6.3.2. Einsatz verschiedener Reduktionsmittel	86
6.3.3. Verfügbarkeit von Hexan.....	87
6.4. Bestimmung der Methylalkylsuccinat-Synthase-Aktivität im Zeitverlauf.....	89
6.5. Temperaturabhängigkeit der Methylalkylsuccinat-Synthase	91
6.6. Substratspektrum der Methylalkylsuccinat-Synthase.....	93
7. Reinigung der nativen Methylalkylsuccinat-Synthase	95
7.1. Anionenaustauschchromatographie an ANX-Sepharose.....	95
7.2. Gelfiltration an Sephadex G 25	96
7.3. Hydroxylapatit-Chromatographie	96
7.4. Bestimmung der relativen Molekülmasse der Methylalkylsuccinat-Synthase ..	99
E Diskussion.....	100

1. Heterologe Expression der Methylalkylsuccinat-Synthase und der Aktivase.....	100
1.1. Klonierungsstrategie und Reinigung der Methylalkylsuccinat-Synthase	100
1.2. Klonierungsstrategie und Reinigung der Aktivase	101
2. Identifikation potentieller Methylalkylsuccinat-Synthase (<i>mas</i>)-Gene	102
3. Methylalkylsuccinat-Synthasen als Glycinradikalenzyme (GRE)	104
4. Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase von Stamm HxN1 im Rohextrakt.....	106
5. Reinigung der nativen Methylalkylsuccinat-Synthase	109
5.1. Aktivität der gereinigten Methylalkylsuccinat-Synthase.....	109
5.2. Zusammensetzung der Methylalkylsuccinat-Synthase	111
F Literaturverzeichnis.....	113
G Anhang.....	121

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Isolierte Bakterien, die unter anaeroben Bedingungen Alkane abbauen ..	8
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme	16
Tabelle 3: Zusammensetzung des Aufschlusspuffers	26
Tabelle 4: Verwendete Vektoren	27
Tabelle 5: Verwendete Primer	27
Tabelle 6: Pipettierschema in der PCR-Reaktion	31
Tabelle 7: Pipettierschema in der Sequenzierungs-PCR	33
Tabelle 8: Pipettierschema für einen Ligationsansatz	35
Tabelle 9: Zusammensetzung der SDS-Gele (10 x 7,5 cm)	40
Tabelle 10: Färbeprotokoll für SDS-PAGE Gele mit Coomassie G250 für PMFP	41
Tabelle 11: Verwendete Antikörper und Antiseren	45
Tabelle 12: GC-Programme für die GC/MS	47
Tabelle 13: PCR-Screening zur Identifikation von Alkan- und Aromatenabbauern	75
Tabelle 14: Massenspektrum-Daten für MPS (Methylester und Dimethylester)	81
Tabelle 15: Reinigungstabelle der nativen Methylalkylsuccinat-Synthase aus Stamm HxN1	96
Tabelle 16: Spezifische Aktivität und Ausbeute der Methylalkylsuccinat Synthase in den Reinigungsfraktionen	109

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Enzymatische Bildung von Benzylsuccinat.....	10
Abbildung 2: <i>bss</i> Operon aus <i>Thauera aromatica</i> mit den Genen der drei Untereinheiten der Benzylsuccinat-Synthase	11
Abbildung 3: Enzymatische Bildung von 1-Methylpentylsuccinat.....	12
Abbildung 4: Postulierter Abbauweg für Alkane in Stamm HxN1	12
Abbildung 5: Genetische Organisation des <i>mas</i> -Operons in Stamm HxN1	13
Abbildung 6: .Modell der Aktivierung und Reaktion der Methylalkylsuccinat-Synthase	15
Abbildung 7: Zielregion der Primer zur <i>mas</i> -Gen Identifizierung in verschiedenen Stämmen	29
Abbildung 8: Konstrukt zur Überexpression der drei <i>mas</i> -Untereinheiten im pET 42 a-c(+)-Vektor	30
Abbildung 9: Syntheseweg des Dimethyl-Methylpentylsuccinats	48
Abbildung 10: Überexpression und Western Blot der β - und γ -Untereinheit (MasE und MasC) von Stamm HxN1	54
Abbildung 11: Reinigungsfractionen der heterolog exprimierten α -Untereinheit.	55
Abbildung 12: Immunisierungsverlauf Tier 1 bei der Herstellung des anti- α -Untereinheit Serums.....	56
Abbildung 13: Reinigungsfractionen der heterolog exprimierten Aktivase.....	58
Abbildung 14: Heterologe Expression und Reinigung des Methylalkylsuccinat-Synthase (Mas)-Gesamtkonstruktes.....	60
Abbildung 15: Das Methylalkylsuccinat-Synthase (Mas) Operon	64
Abbildung 16: Stammbaum abgeleitet vom Alignment der potenziellen α -Untereinheiten von Glycin-Radikal Enzymen	68
Abbildung 17: Partielles Alignment der N-terminalen Domäne potenzieller α -Untereinheiten von Glycinradikal Enzymen	70
Abbildung 18: Relativer Stammbaum abgeleitet vom Alignment der potentiellen Aktivase von OcN1 und anderen Proteinen der „Radical SAM Superfamily“	72

Abbildung 19:	Partielles Alignment der N-terminalen Domäne mit dem Eisen-Schwefel-Cluster Bindungsmotiv (CxxxCxxC) der potentiellen Aktivase von Stamm OcN1 und anderen Proteinen der „Radical SAM Superfamily“	73
Abbildung 20:	Elutionsprofil und MS-Spektren von Methylpentylsuccinat	77
Abbildung 21:	Fragmentierungsmuster potentieller Ester von Methylpentylsuccinat	79
Abbildung 22:	Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase während des Wachstums von Stamm HxN1	83
Abbildung 23:	Einfluss von NO auf die Methylalkylsuccinat-Synthase-Aktivität	84
Abbildung 24:	Bestimmung der optimalen Fumarat-Konzentration für den Methylalkylsuccinat-Synthase Aktivitätstest im Rohextrakt	85
Abbildung 25:	Einfluss verschiedener Reduktionsmittel auf die Methylalkylsuccinat Synthase-Aktivität	87
Abbildung 26:	Einfluss von Cyclodextrinen und HMN auf die Bildung von Methylpentylsuccinat (MPS)	89
Abbildung 27:	Methylalkylsuccinat-Synthase-Aktivität im Zeitverlauf	90
Abbildung 28:	Temperaturabhängige Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase	92
Abbildung 29:	Arrhenius-Graph der Temperaturabhängigkeit für die Bildung von Methylpentylsuccinat	92
Abbildung 30:	Alkanspektrum der Methylalkylsuccinat-Synthase	94
Abbildung 31:	12%ige SDS-PAGE der Reinigungsschritte der MethylalkylsuccinatSynthase aus Stamm HxN1	98
Abbildung 32:	Immunoblot zur Identifizierung der β - und γ -Untereinheit in der gereinigten nativen Methylalkylsuccinat-Synthase	99
Abbildung 33:	Genetische Organisation des OcN1 Operons	103

A Zusammenfassung

Unter anoxischen Bedingungen galt der mikrobielle Abbau von *n*-Alkanen lange Zeit als unmöglich, da in den bis dahin bekannten Abbauwegen eine Aktivierung durch Sauerstoff essenziell war. Erst in den letzten zwei Jahrzehnten konnte der Abbau unter Sauerstoffausschluss durch unterschiedliche Nitrat- und Sulfatreduzierer in Reinkulturen nachgewiesen werden. Über den Aktivierungsmechanismus war jedoch noch wenig bekannt. In Metabolitstudien wurde als möglicher initialer Reaktionsschritt ein Fumarat-Additionsmechanismus analog zum Mechanismus der anaeroben Aktivierung von Alkylbenzolen identifiziert. In Übereinstimmung dazu konnte in dem denitrifizierenden Betaproteobakterium Stamm HxN1 ein homologes Operon für die an der Aktivierung beteiligten Enzyme nachgewiesen werden. Dieses Operon enthält Gene für das potentielle *n*-Alkan aktivierende Enzym und dessen Aktivase.

Ziel dieser Arbeit war es, den postulierten Abbauweg über Fumarat-Addition in Stamm HxN1 durch biochemische Untersuchungen zu bestätigen und das potentielle *n*-Alkan aktivierende Enzym (Methylalkylsuccinat-Synthase) zu charakterisieren. Durch die Entwicklung eines Aktivitätsassays gelang es erstmals, *in vitro* die Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase im Rohextrakt von Stamm HxN1 nachzuweisen. Allerdings war die gemessene Aktivität des Enzyms deutlich geringer als erwartet. Des Weiteren konnte die Methylalkylsuccinat-Synthase während dieser Arbeit erfolgreich gereinigt werden. Da auch das gereinigte Enzym katalytisch aktiv war, konnte der eindeutige Nachweis erbracht werden, dass es sich bei der Methylalkylsuccinat-Synthase um das Startenzym des anaeroben Alkanabbaus in Stamm HxN1 handelt. Zusätzlich wurde durch die Reinigung eine vierte, bisher unbekante, Untereinheit des Enzyms identifiziert. Dessen Homologe wurden auch in allen anderen bisher sequenzierten Alkanabbauern gefunden, in denen die große Untereinheit der Methylalkylsuccinat-Synthase gefunden werden konnte. Eine *in vitro* Aktivierung des in dieser Arbeit erstellten rekombinanten Enzyms zusammen mit der rekombinant expremierten Aktivase war aber bisher erfolglos, da die vierte Untereinheit zu Beginn der Arbeiten an dem genetischen Konstrukt noch nicht bekannt war.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag darauf, die Verbreitung des Fumarat-Additionsmechanismus unter anoxischen Bedingungen näher zu untersuchen. Dafür wurden mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden potentielle Gene anderer *n*-Alkan-verwertender Bakterien identifiziert und hinsichtlich ihrer Verwandtschaft verglichen. Für Stamm OcN1 konnte über eine Fosmid Bibliothek die Sequenz für das gesamte Operon einschließlich Aktivase ermittelt werden. Zusätzlich konnte mit Hilfe von degenerierten Primern in zwei weiteren Stämmen, den sulfatreduzierenden Bakterien Stamm Pnd3 und Stamm TD3, Teilsequenzen der *n*-Alkan aktivierenden Enzyme gefunden werden. Eine Analyse der Sequenzdaten bestätigte die Vermutung, dass die Methylalkylsuccinat-Synthasen eine eigene Klasse innerhalb ihrer Glycinradikalenzym-Familie bilden. Allerdings konnte nicht bei allen *n*-alkanabbauenden Bakterien ein entsprechendes Aktivierungsenzym gefunden werden. Daher ist zu erwarten, dass es neben der Fumarat-Addition noch weitere Aktivierungsmechanismen gibt.

B Einleitung

1. Vorkommen und Eigenschaften von Kohlenwasserstoffen

Kohlenwasserstoffe (allgemeine Formel C_nH_m) stellen eine sehr umfassende und vielfältige organische Stoffgruppe dar. Sie sind Hauptbestandteile von Erdöl und Erdgas und spielen somit eine wichtige Rolle als fossile Energieträger. Erdöl und Erdgas variieren je nach Fundort in ihrer Zusammensetzung. Der Anteil von Kohlenwasserstoffen liegt dabei bei 50% (Schweröl) bis 97%. Weitere Bestandteile sind C- und H- reiche Verbindungen mit Heteroatomen (überwiegend Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel) und Metalle. Erdöl und Erdgas entstehen in einem geochemischen Prozess, bei dem abgestorbene und sedimentierte Biomasse am Meeresboden über einen langen Zeitraum unter hohem Druck umgewandelt wird (Tissot und Welte, 1984). Weiterhin entstehen große Mengen von Kohlenwasserstoffen durch den Stoffwechsel von Pflanzen, Pilzen und Tieren, als auch von Bakterien und Archaeen (Birch und Bachofen, 1988). Sie können dabei als Lock- (Pheromone) und Abwehrstoffe dienen oder übernehmen Schutzfunktionen in diesen Organismen. Häufig ist jedoch weder die genaue Funktion noch die Biosynthese bekannt (Widdel und Rabus, 2001). Für die Biosynthese von Alkanen werden zur Zeit unterschiedliche Wege diskutiert. Eukaryonten haben überwiegend Alkane aus C-Ketten mit einer ungeraden Zahl an Kohlenstoffatomen, so dass eine Entstehung durch Decarbonylierung von gradzahligen Aldehyden denkbar ist (Dennis und Kolattukudy, 1992). In Bakterien dagegen ist das Verhältnis von geraden und ungeraden Kohlenstoffatomen in den Alkanen ausgewogener. Für *Vibrio furnisii* M1 wurde daher ein neuer Syntheseweg über einen primären Alkohol postuliert (Park, 2005).

Chemisch werden Kohlenwasserstoffe unterteilt in aromatische und aliphatische KW. Aromatische KW sind mono- oder polyzyklisch und können unterschiedliche aliphatische Seitenketten besitzen (Bsp: Benzol, Toluol). Polyzyklische Aromaten (PAK) sind kondensierte Benzolringe (Bsp. Naphthalin). Aufgrund des delokalisierten π -Elektronensystems unterscheiden sich aromatische Kohlenwasserstoffe hinsichtlich ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften wesentlich von den aliphatischen Kohlenwasserstoffen. So sind sie z. B. deutlich reaktionsträger als ungesättigte aliphatische Kohlenwasserstoffe. Aliphatische KW können sowohl als unverzweigte

lineare Ketten (Bsp.: *n*-Alkane), als verzweigte Ketten und als Ringstruktur (Bsp.: Cyclohexan, Cyclobutadien) auftreten. Sie werden, abhängig von den auftretenden Bindungstypen, weiter unterteilt in gesättigte (Alkane) und die oben genannten ungesättigten Kohlenwasserstoffe (Alkene, Alkine). Im Gegensatz zu Alkenen und Alkinen, die, wie die Aromaten zusätzlich π -Bindungen im Molekül aufweisen, enthalten Alkane nur σ -Bindungen (C-C und C-H). Die C-H Bindung ist dabei aufgrund der geringen Elektronegativitäts-Differenz zwischen Kohlenstoff und Wasserstoff (Elektronegativitäten nach Pauling H: 2,2; C: 2,55) nahezu unpolar und gehört deshalb mit einer Bindungsdissoziationsenergie von ca. 400 kJ/mol zu den stärksten bekannten Einfachverbindungen. Durch diesen apolaren Charakter, der durch das Fehlen von funktionellen Gruppen noch verstärkt wird, sind Alkane reaktionsträger als Alkene, Alkine oder Aromaten. Dennoch sind einige Bakterien auf den Abbau von Aliphaten und Aromaten spezialisiert und können sie als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen.

2. Abbau von Kohlenwasserstoffen

Der vollständige Abbau von Kohlenwasserstoffen kann sowohl mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor, als auch unter Luftabschluss erfolgen. Unter anoxischen Bedingungen dienen alternativ Nitrat, Eisen (III), Mangan (IV) und Sulfat als Elektronenakzeptoren, aber auch anoxygene Photosynthese ist möglich. Die meiste Energie kann dabei, aufgrund des niedrigeren Redoxpotentials, mit Nitrat und Mangan (IV) als terminalen Elektronenakzeptoren gewonnen werden.

Neben den klassischen Kohlenwasserstoffen (Bsp.: Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Alkane verschiedener Kettenlänge) können auch hydroxylierte (Bsp.: Phenol, *o*-, *m*-, *p*- Cresol) und carboxylierte Verbindungen (Bsp.: Benzoat, Phenylacetat) sowie fluorierte und chlorierte Verbindungen (Bsp.: Fluor- und Chlorbenzoat) als Kohlenstoffquelle genutzt werden (für eine Übersicht siehe Gibson und Harwood, 2002). Bei den Bakterien sind vor allem Vertreter der Proteobakterien für die Verwertung von Kohlenwasserstoffen bekannt (Widdel und Rabus, 2001; Rosenberg 2006; Widdel *et al.*, 2006). Von großem Interesse sind sogenannte „obligat kohlenwasserstoffklastische Bakterien“ (engl. OHCB), die fast ausschließlich mit Erdöl-Komponenten wachsen (Yakimov *et al.*, 2007). Daneben gibt es aber auch Pilze, wie z. B. *Candida tropicalis* und *C. maltosa*, die aerob in der Lage sind, Alkane zu verwerten (Duppel *et al.*, 1973, Iida *et al.*, 2000).

2.1. Aerober Abbau von Alkanen

Unter aeroben Bedingungen erfolgt der initiale Angriff auf das Alkan mit Hilfe von Sauerstoff. Monooxygenasen bauen hierbei ein Sauerstoffatom terminal oder seltener subterminal in das Alkan ein, so dass ein primärer bzw. sekundärer Alkohol entsteht. Das zweite Sauerstoffatom wird zu Wasser reduziert. Als Cofaktoren der Hydroxylierung dienen häufig reduzierte Verbindungen wie NAD(P)H (van Beilen und Funhoff, 2007). Im weiteren Abbauweg wird der primäre Alkohol über ein Aldehyd zur Fettsäure oxidiert. Diese wird über β -Oxidation in Acetyl-CoA umgewandelt. Bei Alkanen mit ungerader C-Atom Anzahl entsteht zunächst Propionyl-CoA, woraus im weiteren Verlauf Succinyl-CoA gebildet wird. Sekundäre Alkohole werden über die entsprechenden Ketone und Ester zu Acetat und einem primären Alkohol umgesetzt. Monooxygenasen wurden bisher in einer Vielzahl von Bakterien, u. a. Proteobakterien (*Alcanivorax borkumensis*, *Ralstonia pickettii*, *Methylocella silvestris*), Actinobakterien (*Mycobacterium bovis*) und Firmicuten (*Geobacillus thermoleovorans*), sowie Pilzen (*Candida albicans*, *Graphium* sp.) nachgewiesen. Häufig enthalten dabei individuelle Alkanabbauer auch mehrere Monooxygenasen mit überlappenden Substratspektren (van Beilen und Funhoff, 2007). Die aerobe Aktivierung von Alkanen über eine Dioxygenase wurde bisher nur für *Acinetobacter* sp. beschrieben, jedoch noch nicht bestätigt. Dabei werden beide Sauerstoffatome in die Alkankette eingeführt, so dass ein *n*-Alkylhydroperoxid entsteht. Diese Reaktion benötigt keine Cofaktoren (Maeng *et al.*, 1996). Eine andere Möglichkeit als der Einbau von Sauerstoff zur aeroben Aktivierung von Alkanen ist bis heute nicht gefunden worden.

Die genetische Organisation der Gene für den Alkanabbau wurde besonders für *Pseudomonas oleovorans* näher untersucht. Auf einem Plasmid (OCT Plasmid) wurden zwei separate Operons (*alkBFGHJKL* und *alkST*) identifiziert, die weite Teile des Alkanabbaus codieren. Die initiale Hydroxylierungsreaktion am Alkan wird dabei von *alkB*, einer in der Cytoplasmamembran integrierten Monooxygenase, katalysiert. Das gesamte *alkBFGHJKL* Operon wird von *alkS* positiv reguliert (Baptist *et al.*, 1963; Fennewald *et al.*, 1973) Ein ähnlicher genetischer Aufbau konnte auch für *Alcanivorax borkumensis* gefunden werden. In dem Genom wurden zwei potentielle *alkB*-Gene sowie ein homologes Gen zu *alkS* identifiziert. Allerdings konnte für *alkS* keine regulatorische Wirkung nachgewiesen werden (van Beilen *et al.*, 2004). Das Genom von *Mycobacterium* sp. TY-6 weist interessanterweise zwei verschiedene Gencluster auf, die

abhängig von dem Substratspektrum induziert werden. So wird das *prmABCD*-Operon in Gegenwart von gasförmigen Alkanen (mit Ausnahme von Methan) verstärkt transkribiert, das *alk*-Cluster dagegen in Gegenwart flüssiger Alkane (C₁₁–C₁₅) (Kotani *et al.*, 2006).

2.2. Anaerober Abbau von Aromaten

Die Aktivierung von Aromaten unter aneroben Bedingungen ist durch die große Stabilität des aromatischen Rings und der damit verbundenen hohen Aktivierungsenergie schwierig. Dennoch wurden in den letzten Jahren viele Organismen isoliert, die in der Lage sind, mit unterschiedlichen Elektronenakzeptoren eine Vielzahl von aromatischen Verbindungen als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen (Shinoda *et al.*, 2005; Kniemeyer *et al.*, 2003; Rabus *et al.*, 1999; Beller *et al.*, 1996).

Auffallend ist, dass die große Vielfalt möglicher Substrate in einige zentrale Metabolite umgewandelt wird. Das wichtigste Intermediat stellt dabei Benzoyl-CoA dar, an welchem sich anschließend die reduktive Ringöffnung vollzieht (Boll *et al.*, 2002). Als initiale Aktivierungsmechanismen der Aromaten werden eine Vielzahl möglicher Mechanismen diskutiert (Heider 2007).

- 1) Sauerstoff-unabhängige Hydroxylierung
- 2) Fumarat-Addition
- 3) Carboxylierung (Inkorporation von CO₂)
- 4) Methylierung

Allerdings konnte eine Carboxylierungs- bzw. Methylierungsreaktion als Aktivierungsschritt noch nicht eindeutig belegt werden. Bei der Hydroxylierungsreaktion durch Dehydrogenasen, wie es für Ethylbenzol in denitrifizierenden Bakterien beschrieben wurde (Kniemeyer und Heider, 2001), wird das C-2 Atom der Ethylkette hydroxyliert. Dagegen konnte in sulfatreduzierenden Bakterien ein Fumarat-Additionsmechanismus als initialer Schritt für den Ethylbenzol-Abbau identifiziert werden (Kniemeyer *et al.*, 2003). Der Fumarat-Additionsmechanismus, bei dem im ersten Schritt succinylierte Zwischenprodukte entstehen, ist weit verbreitet und wurde in diversen Lebensräumen unter Verwendung unterschiedlicher Elektronenakzeptoren nachgewiesen. So werden z. B. auch Toluol (Leuthner *et al.*, 1998, Coschigano 2000), 2-Methylnaphthalin (Musat *et al.*, 2009), *p*-Xylol (Morasch *et al.*, 2005) und *m*-Cresol (Müller *et al.*, 1999) darüber aktiviert. Katalysiert wird der Aktivierungsschritt durch

Radikalenzyme. Eine nähere Beschreibung des Reaktionsablaufes befindet sich in Kapitel 3 Radikalenzyme als Katalysatoren biologischer Reaktionen.

2.3. Anaerober Abbau von Alkanen

Die Nutzung von Alkanen als Kohlenstoffquelle in Abwesenheit von Sauerstoff galt aufgrund der geringen Reaktivität und der darauf beruhenden Notwendigkeit zur Aktivierung, welche bis dahin ausschließlich durch Oxygenasen gezeigt wurde, lange Zeit als nicht möglich. Erst in den letzten 20 Jahren wurden Bakterien isoliert, die in der Lage sind, Alkane unter aneroben Bedingungen zu aktivieren. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der bisher bekannten Alkanabbauer mit den jeweiligen Elektronenakzeptoren bei der anaeroben Atmung sowie den postulierten Aktivierungsmechanismen. Erste Metabolitstudien ergaben für den anaeroben Abbau von Alkanen ähnliche Aktivierungsmechanismen wie bei den Aromaten:

- 1) Fumarat-Addition
- 2) Carboxylierung am C-3 Atom des Alkans mit anorganischem Kohlenstoff

Allerdings wurde bisher nur die Addition von Fumarat mehrfach nachgewiesen (Rabus 2001; Kniemeyer *et al.*, 2007), eine Carboxylierungsreaktion bleibt spekulativ (So *et al.*, 2003, Callaghan *et al.*, 2006). Alternative, bisher unentdeckte Aktivierungsmechanismen sind aufgrund der bisher relativ geringen Anzahl an Reinkulturen durchaus denkbar. Nicht in der Tabelle berücksichtigt sind Konsortien aus Archaeen (überwiegend Vertreter der Ordnung *Methanosarcinales*) und sulfatreduzierenden Bakterien (Deltaproteobakterien), die zur anaeroben Oxidation von Methan (AOM) befähigt sind. Auch wird für nitratreduzierende Bedingungen die anaerobe Aktivierung von Methan über Fumarat-Addition noch diskutiert (Thauer und Shima, 2008).

Über die Aktivierung und den Abbau zyklischer Alkane ist bisher nur wenig bekannt. Für den Abbau von Ethylcyclopentan wurde ebenfalls die Addition von Fumarat als initialer Schritt vorgeschlagen (Rios-Hernandez *et al.*, 2003). Daneben wird Cyclopentan auch in geringen Mengen (ohne Wachstum) durch Stamm HxN1 über Fumarat-Addition aktiviert.

Tabelle 1: Isolierte Bakterien, die unter anaeroben Bedingungen Alkane abbauen

Stamm	Alkan- spektrum ^{a)}	Elektronen- akzeptor	postulierter Aktivierungs- mechanismus	Referenz
HxN1	C ₆ –C ₈	Nitrat	Fumarat-Addition	Ehrenreich <i>et al.</i> , 2000
OcN1	C ₈ –C ₁₂	Nitrat	Fumarat-Addition ^{a)}	Ehrenreich <i>et al.</i> , 2000
HdN1	C ₁₄ –C ₂₀	Nitrat	n.b.	Ehrenreich <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas balearica</i> Stamm BerOc6	C ₁₅ –C ₁₈	Nitrat	n.b.	Grossi <i>et al.</i> , 2008
Hxd3	C ₁₂ –C ₂₀	Sulfat	C1-Addition	Aeckersberg <i>et al.</i> , 1991
<i>Desulfothermus naphthae</i> , TD3	C ₆ –C ₁₆	Sulfat	Fumarat-Addition ^{a)}	Rueter <i>et al.</i> , 1994
<i>Desulfatibacillum</i> sp., Pnd3	C ₁₄ –C ₁₇	Sulfat	Fumarat-Addition ^{a)}	Aeckersberg <i>et al.</i> , 1998
BuS5	C ₃ –C ₄	Sulfat	Fumarat-Addition	Kniemeyer <i>et al.</i> , 2007
<i>Desulfatibacillum alphaticivorans CV2830T</i>	C ₁₃ –C ₁₈	Sulfat	Fumarat-Addition	Cravo-Laureau <i>et al.</i> , 2005
<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> AK-01	C ₁₃ –C ₁₈	Sulfat	Fumarat-Addition	So and Young; 1999
<i>Desulfoglaeba alkanexedens</i> Stamm ALDC ^T	C ₆ –C ₁₂	Sulfat	Fumarat-Addition	Davidova <i>et al.</i> , 2006
<i>Desulfoglaeba alkanexedens</i> Stamm Lake	n.b.	Sulfat	n.b.	Davidova <i>et al.</i> , 2006

^{a)}: Arbeitshypothese dieser Dissertation

n.b.: nicht bekannt

3. Radikalenzyme als Katalysatoren biologischer Reaktionen

Die Entdeckung durch Radikalenzyme katalysierter Reaktionen ist in den letzten 20 Jahren stark angestiegen. Diese Reaktionen stehen oft in Verbindung mit redox-aktiven Cofaktoren wie Flavoproteinen, Quinon oder metallo-Cofaktoren und erstrecken sich über einen weiten Bereich biologischer Reaktionen wie z. B. Antibiotika-Biosynthese (Isopenicillin-N-Synthase), Detoxifizierung (Superoxid-Dismutase) und DNA-Reparatur (DNA Photolyase); Frey *et al.*, 2006. Eine sehr gut untersuchte Gruppe von Radikalenzymen ist die Familie der Glycinradikal-Enzyme (GRE). Mitglieder dieser Familie weisen ein charakteristisches Motiv (RVXG) in ihrer Aminosäurekette auf. Dieses Motiv beinhaltet den für die Aktivität der GRE notwendigen Glycin-Rest, an dem das Radikal gebildet wird. Glycinradikale zeigen ein charakteristisches Elektronenparamagnetisches-Resonanz-Spektrum (EPR), welches ihre Identifizierung ermöglicht (Duboc-Toia *et al.*, 2003; Selmer *et al.*, 2005). Des Weiteren weisen alle GRE ein hochkonserviertes Cystein in ihrer Aminosäurekette auf. Dieses Cystein ist im nativen Enzym räumlich benachbart zum Glycin lokalisiert und an der Katalyse in Form eines Thiylradikals beteiligt (Himo, 2005). Alle GRE sind aufgrund ihres Radikal-Charakters sehr sauerstoffempfindlich und deshalb nur unter anoxischen Bedingungen aktiv. Die Gegenwart von Sauerstoff führt zur Spaltung der Peptidkette am Glycinradikal und inaktiviert das Enzym irreversibel (Buckel und Golding, 2006). Mitglieder der GRE sind unter anderem die Benzylsuccinat-Synthase, die Pyruvat-Formiat-Lyase, die Glycerol-Dehydratase, die 4-Hydroxyphenylacatat-Decarboxylase und die anaerobe Ribonukleotid-Reduktase (Klasse III) (Selmer *et al.*, 2005). GRE benötigen zur Radikalbildung am Glycin ein weiteres Radikalenzym. Die aktivierenden Enzyme (des Weiteren als Aktivasen bezeichnet) gehören zur Radikal-SAM (S-Adenosylmethionin)-Superfamilie. Mitglieder dieser Familie weisen typischerweise ein $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster mit einem konservierten CXXXCXXC-Cystein Motiv auf. Die Cysteine bilden drei Liganden des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters, wobei der vierte Ligand unbekannt ist. Aufgrund der Eisen-Schwefel-Cluster sind SAM-Proteine ebenfalls sehr labil und werden durch Sauerstoff leicht inaktiviert. Datenbanksuchen gegen das Cystein-Motiv ergaben, dass ca. 600 Proteine zu der SAM-Superfamilie zu zählen sind (Sofia *et al.*, 2001). Der genaue Mechanismus der GRE-Aktivierung und Katalyse ist unter Abschnitt 3.3 beschrieben.

3.1. Anaerober Abbau von Toluol

Die Aktivierung von Toluol unter anoxischen Bedingungen erfolgt über Fumarat-Addition und wurde für viele denitrifizierende Bakterien, wie z. B. *Thauera aromatica* (Biegert *et al.*, 1996), *Azoarcus* sp. Stamm T (Beller und Spormann, 1997) und *Magnetospirillum* sp. TS-6 (Shinoda *et al.*, 2005), untersucht. Daneben wurde dieser Mechanismus auch bei Eisen(III)-reduzierenden (Kane *et al.*, 2002), sulfatreduzierenden (Beller *et al.*, 1996), phototrophen (Zengler *et al.*, 1999) Stämmen und methanogenen Konsortien (Washer und Edwards, 2007) beschrieben. Das katalysierende Enzym dieser Reaktion wurde nach dem entstehenden Reaktionsprodukt Benzylsuccinat-Synthase (Bss) genannt und wird in die Familie der Glycinradikal-Enzyme (GRE) eingeordnet. Das Benzylsuccinat wird weiter zum zentralen Intermediat Benzoyl~CoA metabolisiert.

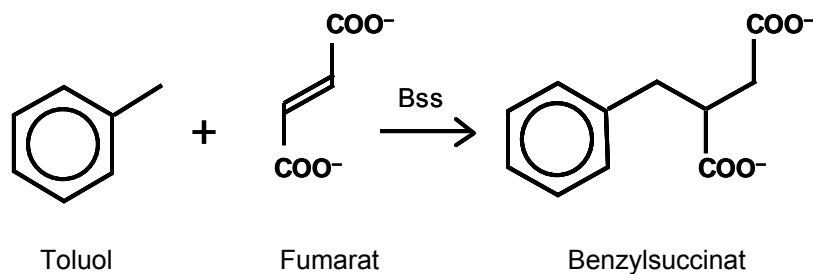


Abbildung 1: Enzymatische Bildung von Benzylsuccinat
 Katalysiert durch die Benzylsuccinat-Synthase (Bss) entsteht durch Addition der Methyl-Gruppe von Toluol an Fumarat das Reaktionsprodukt Benzylsuccinat.

Die Benzylsuccinat-Synthase wurde erstmals 1998 aus *T. aromatica* gereinigt und näher charakterisiert (Leuthner *et al.*, 1998). Sie besteht aus drei Untereinheiten: einer großen α -Untereinheit (97,6 kDa) und zwei kleinen Untereinheiten, der β - (8,6 kDa) und γ -Untereinheit (6,6 kDa). Das typische RVXG-Motiv von GRE ist im C-Terminus der α -Untereinheit lokalisiert. Das Holoenzym setzt sich aus jeweils zwei der drei Untereinheiten zusammen ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$). Dieser Aufbau wurde durch die Reinigung der Benzylsuccinat-Synthase aus *Azoarcus* sp. Stamm T bestätigt (Beller *et al.*, 1999). Das katalytisch wirksame Enzym muss jedoch zuvor, wie oben beschrieben, durch eine Aktivase aktiviert werden.

Die Gene für die α -, β - und γ -Untereinheit der Benzylsuccinat-Synthase und die Aktivase bilden ein Operon, d. h. sie werden gemeinsam transkribiert. Die Aktivase liegt dabei oberhalb zu den drei Untereinheiten (Abb. 2). Die Region auf der DNA umfasst dabei ca. 4,5 kb (Leuthner *et al.*, 1998). Darüber hinaus kann das Operon weitere Gene bisher unbekannter Funktion umfassen (Kube *et al.*, 2004). Das *bssA* Gen, welches die große Untereinheit der Benzylsuccinat-Synthase kodiert, wird dabei neuerdings verstärkt als Markergen in Studien zur Identifizierung potentieller Toluolabbauer in kohlenwasserstoffverunreinigten Habitaten eingesetzt (Winderl *et al.*, 2007, Beller *et al.*, 2008).

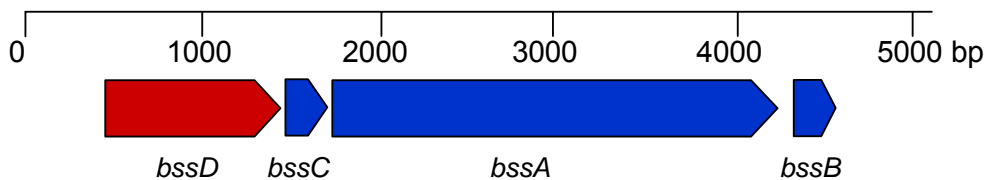


Abbildung 2: *bss* Operon aus *Thauera aromatica* mit den Genen der drei Untereinheiten der Benzylsuccinat-Synthase
Untereinheiten: *bssC* (γ -Untereinheit), *bssA* (α -Untereinheit) und *bssB* (β -Untereinheit). Gen *bssD* kodiert die Aktivase der Benzylsuccinat-Synthase (nach Leuthner *et al.*, 1998).

3.2. Anaerober Abbau von Hexan in Stamm HxN1

Gestützt durch Metabolitstudien wurde in Stamm HxN1 für die anaerobe Aktivierung von Hexan ein ähnlicher Mechanismus wie bei der anaeroben Aktivierung von Toluol postuliert (Wilkes *et al.*, 2003, Rabus *et al.*, 2001). Elektronen-Paramagnetische-Resonanz (EPR)-Studien belegten deutlich die Existenz eines organischen Radikals beim Wachstum des Stammes mit Hexan, nicht jedoch bei Wachstum mit Capronat. Deshalb wurde vermutet, dass, analog zum Toluolabbau, im ersten Schritt Hexan über einen Radikalmechanismus an Fumarat addiert wird, wodurch 1-Methylpentylsuccinat gebildet wird. Das postulierte katalysierende Enzym wurde als Methylalkylsuccinat-Synthase (Mas) bezeichnet.

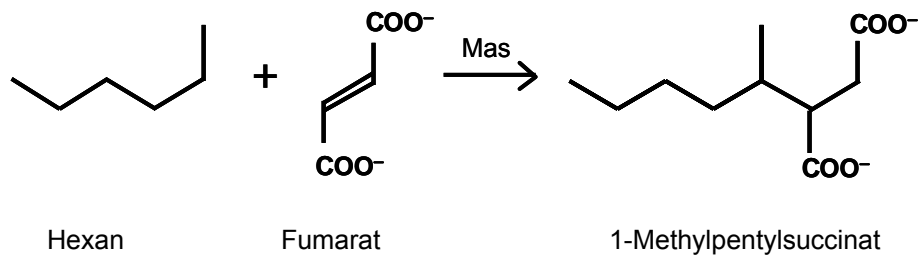


Abbildung 3: Enzymatische Bildung von 1-Methylpentylsuccinat
 Katalysiert durch die Methylalkylsuccinat-Synthase (Mas) entsteht durch Addition von Hexan an Fumarat das Reaktionsprodukt Methylpentylsuccinat.

Im weiteren Reaktionsverlauf wird zunächst aus der freien Säure wahrscheinlich ein CoA-Thioester (1-Methylpentylsuccinyl-CoA) gebildet. Durch Umlagerung des Kohlenstoffgerüsts entsteht 2-Methylhexylmalonyl-CoA, welches in einem nächsten Schritt zu 4-Methyloctanoyl-CoA decarboxyliert wird. Die weiteren Abbauschritte entsprechen der β -Oxidation von Fettsäuren bis hin zu CO_2 als terminalem Abbauprodukt. Während dieses Prozesses kann Fumarat regeneriert werden (Wilkes *et al.*, 2003).

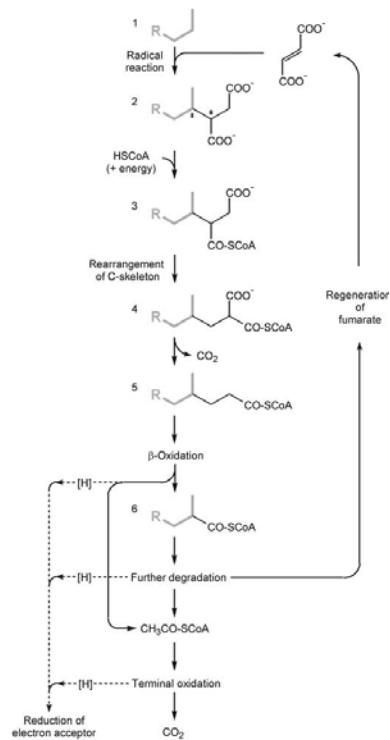


Abbildung 4: Postulierter Abbauweg für Alkane in Stamm HxN1
 (aus Wilkes *et al.*, 2003)

Im Genom von Stamm HxN1 konnte ein Operon mit sieben offenen Leserahmen (ORFs) identifiziert werden, dessen Gene unter anderem die homologen Proteine zu den drei Untereinheiten der Benzylsuccinat-Synthase und des aktivierenden Enzyms kodieren (Grundmann *et al.*, 2008). Die größte Ähnlichkeit besteht dabei zwischen dem Protein MasD (theoretische Größe 95 kDa) und der α -Untereinheit der Benzylsuccinat-Synthase. Auch MasD enthält das charakteristische Glycinradikal Motiv (RVXG) im C-terminalen Bereich des Proteins und weist das in allen GRE hochkonservierte Cystein in der Aminosäurekette auf. Das für die benötigte Aktivase typische CXXXCXXC-Cystein Motiv konnte in der abgeleiteten MasG-Sequenz identifiziert werden. Im Gegensatz zur Bss ist die Aktivase also unterhalb der drei Untereinheiten lokalisiert. *MasC*, γ -Untereinheit und *masE*, β -Untereinheit kodieren die beiden kleinen Untereinheiten. Aufgrund des ähnlichen Reaktionsmechanismus zur Toluolaktivierung wird für das Holoenzym ebenfalls eine $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Komposition angenommen (Grundmann *et al.*, 2008). Den anderen drei Genen des Operons (*masA*, *masB* und *masF*) konnte bisher keine direkte Beteiligung am Hexan-Abbau nachgewiesen werden. *MasA* kodiert eine mögliche Acyl-CoA Dehydrogenase, *masF* eine Transposase. Zum Genprodukt von *masB* gibt es bisher keine beschriebene Funktion in anderen Organismen.

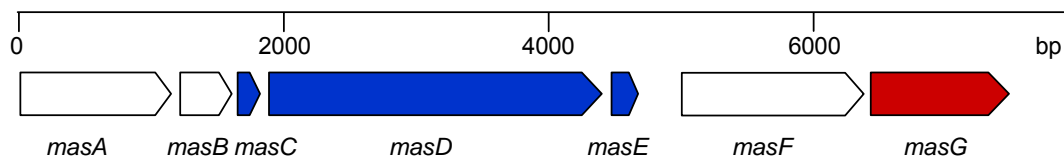


Abbildung 5: Genetische Organisation des *mas*-Operons in Stamm HxN1
Die Gene *masC* (γ -Untereinheit), *masD* (α -Untereinheit) und *masE* (β -Untereinheit) (blau) kodieren für die drei potentiellen Untereinheiten der Methylalkylsuccinat-Synthase, *masG* (rot) kodiert die Aktivase. Das Genprodukt von *masA* ist möglicherweise eine Acyl-CoA Dehydrogenase, *masF* kodiert eine Transposase. *MasB* kodiert ein Protein bislang unbekannter Funktion (nach Grundmann *et al.*, 2008).

3.3. Aktivierung und Reaktion der Methylalkylsuccinat-Synthase

Die Aktivierung der Methylalkylsuccinat-Synthase erfolgt wahrscheinlich über die Aktivase MasG, ein Enzym der S-Adenosylmethionin (SAM)-Superfamilie. In einem ersten Schritt wird das $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster von MasG reduziert und überträgt ein Elektron auf das Sulfonium-Ion von SAM, welches als Cosubstrat in der Reaktion dient. Dadurch wird SAM reaktiv gespalten, wobei neben Methionin ein hochreaktives 5' Desoxyadenosylradikal entsteht (Abb 6). Das 5' Desoxyadenosylradikal abstrahiert im Anschluss ein Wasserstoffatom vom Glycin im aktiven Zentrum der Mas, so dass ein stabiles Glycylradikal gebildet wird. Diese Form entspricht der aktiven Form des Enzyms. Im weiteren Reaktionsverlauf zieht das Glycinradikal ein Wasserstoffatom von einem benachbarten Cystein ab, wodurch vorübergehend ein Thiylradikal entsteht. Das Thiylradikal aktiviert das Substrat Hexan am C-2 Atom der Kohlenstoffkette unter Bildung eines sekundären Hexylradikals. Dieses Substratradikal wird an Fumarat addiert, wobei ein 1-Methylpentylsuccinat-Radikal entsteht. In einem letzten Schritt wird nun erneut ein Wasserstoffatom vom Cystein abstrahiert und auf das 1-Methylpentylsuccinat-Radikal übertragen, so dass Methylpentylsuccinat entsteht. Das Cystein im aktiven Zentrum der Methylalkylsuccinat-Synthase geht wieder in seine radikalische Form über und steht für einen erneuten Reaktionszyklus zur Verfügung bzw. kann in die stabilere Form des Glycinradikals überführt werden.

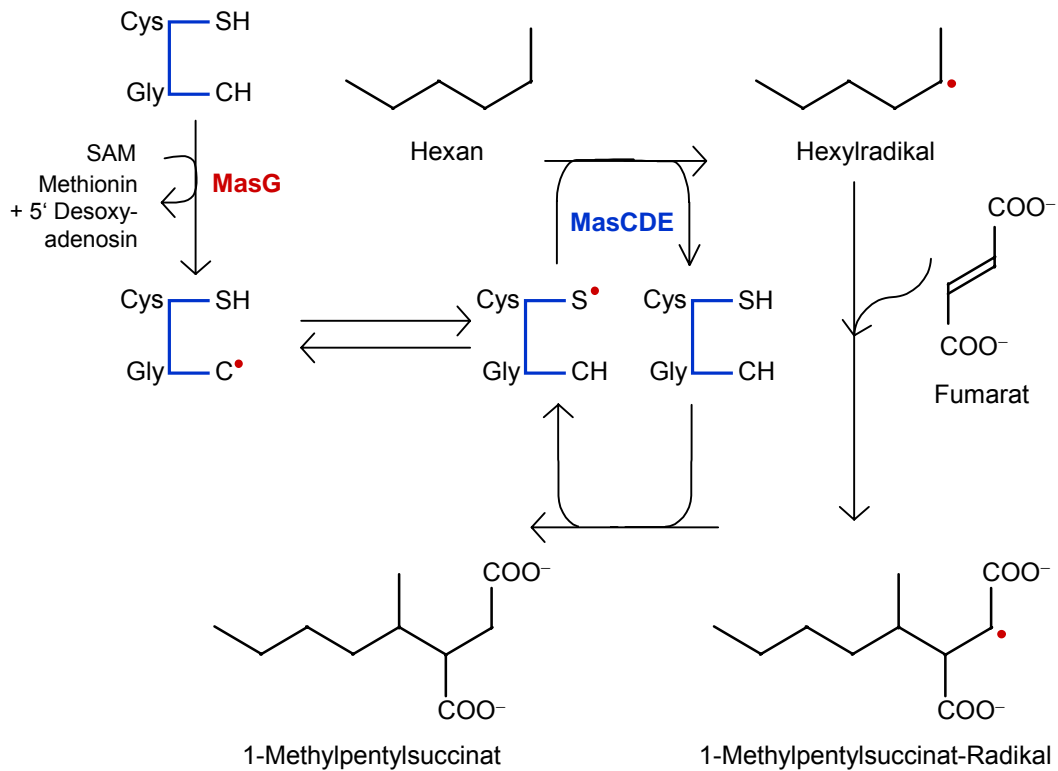


Abbildung 6: Modell der Aktivierung und Reaktion der Methylalkylsuccinat-Synthase (erweitert nach Buckel und Golding, 2006)

Unter S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)-Verbrauch wird durch eine Aktivase (MasG) ein Radikal in die Methylalkylsuccinat-Synthase (MasCDE)-Seitenkette eingebracht. Aktiviertes MasCDE katalysiert die Addition von Hexan an Fumarat durch zwischenzeitliche Übertragung des Radikals auf Hexan. 1-Methylpentylsuccinat wurde als Zwischenprodukt beim anaeroben Wachstum mit Hexan in Metabolitstudien identifiziert. EPR-Studien (Electron Paramagnetic Resonance) belegten die Existenz eines Glycin-Radikalenzyms (Grundmann *et al.*, 2008).

C Material und Methoden

1. Chemikalien, Gase und Enzyme

Sämtliche Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Fluka/Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Serva (Heidelberg) bezogen. Reinstwasser wurde durch die OPTILAB-Standard „membraPure“ Anlage (Continental Water Systems Corporation, San Antonio, USA) erhalten. Radioaktiv markiertes [α - 33 P]-dATP wurde von Hartmann Analytik (Braunschweig) bezogen. Die verwendeten Gase (N₂, 99,999%; CO₂ 99,8%) und Gasgemische (N₂/CO₂, 90/10, v/v) wurden von Air Liquide (Düsseldorf) geliefert.

Produkte für molekularbiologische Arbeiten und Enzyme wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe) und New England BioLabs (NEB, Frankfurt) bezogen. Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Fermentas (St. Leon-Rot) erworben. Die Protein- und Peptid-Kaninchen-Antiseren wurden von Pineda-Antikörper-Service (Berlin) hergestellt.

2. Mikrobiologische Methoden

2.1. Organismen

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

a) anaerobe *n*-Alkanabbauer

Stamm	<i>n</i> -Alkanspektrum	Elektronen-akzeptor	Referenz
HxN1	C ₆ -C ₈	Nitrat	Ehrenreich <i>et al.</i> , 2000
OcN1	C ₈ -C ₁₂	Nitrat	Ehrenreich <i>et al.</i> , 2000
<i>Desulfothermus naphthae</i> (TD3)	C ₆ -C ₁₆	Sulfat	Rueter <i>et al.</i> , 1994
<i>Desulfatibacillum</i> sp. Pnd3	C ₁₄ -C ₁₇	Sulfat	Ackersberg <i>et al.</i> , 1998

Fortsetzung Tabelle 2: verwendete Bakterienstämme

b) Klonierungs- und Expressionsstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E.coli</i> Top10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen Manual (One Shot TOP 10 Competent cells)
<i>E.coli</i> BL21 Star (DE3)	F- <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen Manual (One Shot BL21(DE3) Competent cells)
<i>E.coli</i> EPI300	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>endA1 araD139</i> Δ (<i>ara,leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ^{-} <i>rpsL nupG trfA dhfr</i>	Epicentre Manual (Copy Control Fosmid Library Production Kit)

Die Wildtyp-Stämme OcN1 und HxN1 wurden unter denitrifizierenden Bedingungen mit *n*-Hexan (HxN1) und *n*-Octan (OcN1) als Kohlenstoffquelle aus Sediment-Proben (Bremen) isoliert. *Desulfothermus naphthae* TD3 wurde aus Sediment des Guaymas-Becken mit *n*-Decan als Kohlenstoffquelle, *Desulfatibacillum* sp. Pnd3 aus Schlammvulkanproben mit *n*-Pentadecan als Kohlenstoffquelle isoliert.

2.2. Nährmedien

2.2.1. Anerobes Medium zur Anzucht von Stamm HxN1 und Stamm OcN1

Grundmedium

Für das Grundmedium wurden die hitzestabilen Salze in H₂O gelöst und in einer Schottflasche mit Begasungsaufsatz autoklaviert (20 min, 121 °C).

KH ₂ PO ₄	0,5 g
NH ₄ Cl	0,3 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Nach dem Autoklavieren wurde das Medium unter einer N₂/CO₂ (90/10, v/v) Atmosphäre abgekühlt und die hitzelabilen Komponenten aus sterilen Stammlösungen zugesetzt.

Spurenelemente (komplexiert)	1 ml/l
Selenit-Wolframat-Lösung	1 ml/l
Vitamingemisch	1 ml/l
Vitamin B ₁₂ -Lösung	1 ml/l
Riboflavin-Lösung	1 ml/l
Thiamin-Lösung	1 ml/l
NaHCO ₃ -Lösung (1 M)	30 ml/l
Ascorbat-Lösung (1 M)	2 ml/l

Der pH-Wert des Mediums lag bei 7,0 – 7,2. Die organischen Substrate und Nitrat als Elektronenakzeptor wurden je nach Bedarf steril zugesetzt.

Stammlösungen

a) Spurenelemente (komplexiert)

Folgende Salze wurden in ca. 900 ml H₂O unter leichtem Erwärmen gelöst:

FeSO ₄ · 7 H ₂ O	2,1 g
Na ₂ -EDTA	5,2 g
H ₃ BO ₃	30,0 mg
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	100,0 mg
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	190,0 mg
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	24,0 mg
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	2,0 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	144,0 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	36,0 mg
H ₂ O	ad 1000 ml

Der pH-Wert der Spurenelementlösung wurde mit NaOH auf 6,0 – 6,5 eingestellt und die Lösung autoklaviert und bei 4°C dunkel gelagert.

b) Selenit-Wolframat-Lösung

NaOH	400 mg
Na ₂ WO ₄ · 2 H ₂ O	8 mg
Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	6 mg
H ₂ O	ad 1000 ml

Die Selenit-Wolframat-Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C dunkel gelagert.

c) Vitamingemisch

4-Aminobenzoesäure	40 mg
D (+)-Biotin	10 mg
Nicotinsäure	100 mg
Calcium-D - (+) - Pantothenat	50 mg
Pyridoxin · 2H ₂ O	150 mg
Thiaminchlorid Hydrochlorid	100 mg
H ₂ O	ad 1000 ml

Die Lösung wurde über eine Cellulose-Acetat Membran (Filtropur BT50; Porengröße 0,2 µm, Sarstedt) sterilfiltriert und bei 4°C dunkel gelagert.

d) Vitamin B₁₂-Lösung

Cyanocobalamin	50 mg
H ₂ O	ad 1000 ml

Die Lösung wurde über eine Cellulose-Acetat Membran sterilfiltriert und bei 4°C dunkel gelagert.

e) Riboflavin-Lösung

Eisessig	1 ml
Riboflavin	25 mg
H ₂ O	ad 1000 ml

Die Lösung wurde über eine Cellulose-Acetat Membran sterilfiltriert und bei 4°C dunkel gelagert.

f) Thiamin-Lösung

Thiaminchlorid Hydrochlorid	100 mg
H ₂ O	ad 1000 ml

Die Lösung wurde über eine sterilfiltriert und bei 4°C dunkel gelagert.

g) NaHCO₃-Lösung (1M)

NaHCO ₃	84 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Die Lösung wurde in 60 ml Aliquots auf Serumflaschen verteilt und mit gasdichten Septen verschlossen. Die Flaschen wurden wiederholt mit CO₂ begast, geschüttelt und evakuiert (3-4 Wiederholungen), um Sauerstoff aus der Lösung zu entfernen. Nach dem Autoklavieren erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur.

h) Ascorbat-Lösung (1 M)

In einem Eisbad wurden 17,6 g Ascorbinsäure in 100 ml anoxischem H₂O mit 10 M NaOH unter Rühren neutralisiert. Die Lösung wurde über einen Sterilfilter aus Cellulose-Acetat filtriert, mit N₂ begast und bei 4°C dunkel gelagert.

Die Ascorbat-Lösung wurde dem Medium zur chemischen Reduktion der Bestandteile zugesetzt.

2.2.2. Anaerobes Medium zur Anzucht von *Desulfothermus naphthae* (Stamm TD3)

Grundmedium

Für das Grundmedium wurden die hitzestabilen Salze in H₂O gelöst und in einer Schottflasche mit Begasungsaufsatz autoklaviert (20 min, 121 °C).

Na ₂ SO ₄	4,0	g
KH ₂ PO ₄	0,2	g
NH ₄ Cl	0,25	g
NaCl	20,0	g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	9,8	g
KCl	0,5	g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1	g
H ₂ O	ad 1000	ml

Nach dem Autoklavieren wurde das Medium unter einer N₂/CO₂ (90/10, v/v) Atmosphäre abgekühlt und die hitzelablen Komponenten aus sterilen Stammlösungen zugesetzt.

Spurenelemente (sauer)	1	ml/l
Selenit-Wolframat-Lösung	1	ml/l
Vitamingemisch	1	ml/l
Vitamin B ₁₂ -Lösung	1	ml/l
Riboflavin-Lösung	1	ml/l
Thiamin-Lösung	1	ml/l
NaHCO ₃ -Lösung (1 M)	30	ml/l
Na ₂ S · 9 H ₂ O (1 M)	1	ml/l

Der pH-Wert des Mediums wurde mit HCl auf pH 6,8 eingestellt.

Stammlösungen

Die Stammlösungen entsprachen bis auf die Spurenelement-Lösung denen des Grundmediums von Stamm HxN1 und Stamm OcN1. Die Zusammensetzung der Spurenelemente wich dabei folgendermaßen ab:

- Die Spurenelement-Lösung für *Desulfothermus naphthae* enthielt kein Na-EDTA, statt dessen wurden der Lösung 13 ml/l HCl (25%) zugesetzt.
- Die $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ Menge pro Liter Lösung lag bei 5,25 g, die $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Menge betrug 0,36 g.

Das Na_2S diente zur chemischen Reduktion der Mediumsbestandteile. Für die Na_2S -Lösung wurde eine möglichst großer $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ Kristall gewogen und anschließend in der entsprechenden H_2O Menge unter N_2 -Begasung gelöst. Die Lösung wurde autoklaviert.

2.2.3. Anaerobes Medium zur Anzucht von *Desulfatibacillum* sp. (Stamm Pnd3)

Grundmedium

Für das Grundmedium wurden die hitzestabilen Salze in H_2O gelöst und in einer Schottflasche mit Begasungsaufsatz autoklaviert (20 min, 121 °C).

Na_2SO_4	0,2	g
KH_2PO_4	0,2	g
NH_4Cl	0,25	g
NaCl	1	g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,4	g
KCl	0,5	g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,1	g
H_2O	ad 1000	ml

Nach dem Autoklavieren wurde das Medium unter einer N_2/CO_2 (90/10, v/v) Atmosphäre abgekühlt und die hitzelabilen Komponenten aus sterilen Stammlösungen zugesetzt.

Spurenelemente (komplexiert)	1 ml/l
Selenit-Wolframat-Lösung	1 ml/l
Vitamingemisch	1 ml/l
Vitamin B ₁₂ -Lösung	1 ml/l
Riboflavin-Lösung	1 ml/l
Thiamin-Lösung	1 ml/l
NaHCO ₃ -Lösung (1 M)	30 ml/l
Na ₂ S · 9 H ₂ O (1 M)	1 ml/l

Stammlösungen

Die Stammlösungen entsprachen bis auf der Selenit-Wolframat-Lösung denen des Grundmediums von Stamm HxN1 und Stamm OcN1.

Selenit-Wolframat-Lösung für *Desulfatibacillum* sp. (Stamm Pnd3):

NaOH	400 mg
Na ₂ WO ₄ · 2 H ₂ O	32 mg
Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	6 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	24 mg
H ₂ O	ad 1000 ml

Zusätzlich wurden dem Medium noch 2,0 ml einer sterilfiltrierten Cystein-Lösung (0,5 M, pH 7 in Wasser) und Natrium-Dithionit in einer Konzentration von 0,1 mM zugesetzt. Der pH-Wert des Mediums wurde mit HCl auf pH 6,7 eingestellt.

2.2.4. Aerobes Medium zur Anzucht von *Escherichia coli*

LB -Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Für feste Medien wurde dem Ansatz 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

2.3. Anzucht der Zellen

2.3.1. Zellanzucht der anaeroben *n*-Alkanabbauer

Für die Stammkulturhaltung wurden die Stämme HxN1 und OcN1 unter anoxischen, denitrifizierenden Bedingungen mit *n*-Hexan (HxN1) und *n*-Octan (OcN1) bzw. Capronat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert. Um mögliche toxische Effekte zu vermeiden, wurden die Alkane in einer inerten organischen Trägerphase mit einer Endkonzentration von 5% (v/v) der Trägerphase zugesetzt. Als Trägerphase diente 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan (HMN) oder dickflüssiges Paraffin bei Reinkulturen, welche jeweils autoklaviert und unter N₂-Atmosphäre gelagert wurden. Capronat wurde in einer Endkonzentration von 3 mM direkt dem Medium zugegeben. Die Anfangskonzentration von Nitrat betrug 1 mM. Der Nitratgehalt der Kulturen wurde über Mercoquant–Nitrat–Teststäbchen (Merck, Darmstadt) qualitativ gemessen und gegebenenfalls wurde erneut Nitrat zugesetzt (bis zu 10 mM Nitrat). Die Kulturen wurden unter Schütteln liegend bei 28°C inkubiert, ohne das die Trägerphase den Stopfen berührte. Das Inokulationsvolumen betrug 2-5% (v/v) einer wachsenden Bakterienkultur.

Massenanzuchten des Stammes HxN1 wurden in 20 bzw. 50 Liter Kulturflaschen (Ochs, Bovenden/Lengler) unter anoxischen Bedingungen mit 5% (v/v) *n*-Hexan in Paraffin als Trägerphase durchgeführt. Die Kulturen wurden durch Magnetrührer gerührt. Die Temperierung auf 28°C erfolgte mittels eines Wasserbades. Nach der Ernte von ca. 18 bzw. 45 Litern Kultur (siehe Material und Methoden 2.4.1) wurde die restliche Kultur unter N₂/CO₂-Begasung mit frischem Medium aufgefüllt und gegebenenfalls erneut Nitrat und Hexan zugesetzt. Der Nitrat- und Nitritgehalt der Kulturen wurde über Mercoquant–Nitrat-Teststäbchen und mittels HPLC (siehe Material und Methoden 4.11) bestimmt.

Desulfothermus naphthae TD3 wurde mit *n*-Decan als Kohlenstoffquelle kultiviert. Die Konzentration von *n*-Decan betrug 10% (v/v) in HMN als Trägerphase. Zusätzlich wurde dem Medium 0,2 mM Natrium-Dithionit zugesetzt. Das Wachstum der Kultur wurde über die Entstehung von Schwefelwasserstoff beobachtet. Bei einer Konzentration von ca. 10 mM H₂S wurde die Kultur geerntet. Die Ansätze wurden bei 60°C liegend inkubiert. Das Animpfen erfolgte mit 5% (v/v) einer wachsenden Kultur.

Die Anzucht von *Desulfatibacillum* sp. Stamm Pnd3 erfolgte mit 4 mM Capronat als Kohlenstoffquelle. Die Kultur wurde bei 28°C im Dunkeln ohne Schütteln inkubiert. Auch hierbei diente die Bildung von Schwefelwasserstoff als Wachstumsindikator.

2.3.2. Zellanzucht von *Escherichia coli*

E.coli wurde in flüssigem LB-Medium in Röhrchen (5 ml Kulturvolumen) bzw. 250 ml Erlenmeyerkolben (50 ml Kulturvolumen) kultiviert. Bei Bedarf (anhängig vom eingesetzten Vektor) wurden Antibiotika in entsprechenden Konzentrationen zugesetzt (siehe Tab. 4). Das Wachstum erfolgte über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (180 rpm). LB-Agarplatten wurden ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.4. Zellernte von Alkanabbauern unter anoxischen Bedingungen

2.4.1. Kontinuierliche Ernte

Die 20 bzw. 50 Liter Kulturen wurden in einer kontinuierlichen Erntezentrifuge (Contifuge stratos, Heraeus Instruments, Hanau) mit einem Durchfluss von ca. 200 ml/min bei 17000 rpm und 4°C geerntet. Dabei wurde in den Kulturflaschen durchgängig ein Druck von 0,1 bar N₂ aufrechterhalten. Nach der Zentrifugation wurde der Rotor sofort in eine Anaerobenkammer mit Stickstoffatmosphäre eingeschleust, dort geöffnet und die Zellen in Serumflaschen überführt. Die Zellen wurden entweder direkt zum Zellaufschluss eingesetzt oder bei –80°C in Serumflaschen mit Butylstopfen eingefroren.

2.4.2. Diskontinuierliche Ernte

Um eine Ernte unter Sauerstoffausschluss durchführen zu können, wurde ein Teil einer 20 Liter-Kultur direkt unter 0,1 bar N₂ Begasung in die Anaerobenbox eingeleitet und in 500 ml Zentrifugenbecher überführt. Die Becher wurden zum Ausgasen mindestens zwei Tage vor Versuchsbeginn in die Anaerobenkammer eingeschleust. Die Zentrifugation erfolgte in einer Avanti J-26 XP Zentrifuge (Beckmann Coulter, Krefeld) bei 9000 rpm und 4°C für 25 min. Zur weiteren Verwertung der Zellpellets (analog zur kontinuierlichen Ernte) wurden die Becher sofort wieder in die Anaerobenkammer eingeschleust.

2.5. Herstellung von Zellextrakten

Für die Herstellung von Zellextrakten wurden entweder frisch geerntete Zellen eingesetzt oder bei -80°C gelagerte Zellen auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden 1:1 (w/w) in Aufschlusspuffer (siehe Tab. 3) resuspendiert und in der Anaerobenkammer in eine French-Press Zelle überführt. Der Aufschluss erfolgte mit einer French-Press (Sim Aminco Spectronic Instruments, Rochester, USA) bei einem Druck von ca. 1000 psig (70 bar), wobei der aufgeschlossene Extrakt mit Hilfe einer Kanüle direkt in eine anaerobisierte Serumflasche mit Butylstopfen geleitet wurde. In der Serumflasche waren 0,25 mg/ml DNaseA zum Verdau und Glaskügelchen zur mechanischen Zerkleinerung der DNA vorgelegt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden für ca. 30 min in einem Überkopf-Schüttler bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde der Zellextrakt in 2 ml Eppendorf-Cups überführt und 25 min bei $20000 \times g$ in einer in der Anaerobenbox stehenden Zentrifuge zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der zellfreie Überstand abgenommen und entweder direkt verwertet oder in luftdicht verschließbaren Glasgefäßen bei -20°C bzw. -80°C gelagert. Alle eingesetzten Kunststoffgefäße wurden vor ihrer Verwendung mindestens 24 h in der Anaerobenkammer gelagert.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Aufschlusspuffers

Substanz	Konzentration
Tris-HCl	100 mM
Fumarat	5 mM
Dithiothreitol	8 mM
Natriumdithionit	4 mM
Titan (III)-Citrat	4 mM
Glycerin (anoxisch)	20 % (v/v)

Der pH-Wert des Aufschlusspuffers wurde auf 8,0 eingestellt.

3. Molekularbiologische Methoden

3.1. Vektoren und Primer

Tabelle 4: Verwendete Vektoren

Vektor	Resistenz (Konzentration im Medium (µg/ml))	Hersteller
pET-42a-c(+)	Kanamycin (30)	Novagen
pT7-SBP-2 Expressionsvektor	Ampicillin (100)	Sigma
pCR 4-TOPO Vektor	Ampicillin (100)	Invitrogen
pCC1Fos	Chloramphenicol (12,5)	Epicentre

Primer wurden von MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert. Bis zu einer Länge von 50 Nukleotiden wurden die Primer chromatographisch nach HPST (high purity salt free)-Technik (MWG interner Standard) aufgereinigt. Bei einer Länge von über 50 Nukleotiden wurden die Primer mittels HPLC gereinigt.

Tabelle 5: Verwendete Primer

Zielgen Sequenz (5' → 3')	Restriktions- schnittstelle
Überexpression der α -Untereinheit (<i>masD</i>) von Stamm HxN1	
α -fw: <u>GCGGATCC</u> ACTGCAACTTCAACACTATCCA	BamHI
α -rev: CCGCTCGAGTTAGCCTAGCCCCCTGGACGGT	XhoI
Überexpression der β -Untereinheit (<i>masE</i>) von Stamm HxN1	
β -fw: CAGAAGCTTCCAAATGCACAGAATGTGGCCA	HindIII
β -rev: AGCTCGAGCTAACCTTCGGCCAAGTTTT	XhoI
Überexpression der γ -Untereinheit (<i>masC</i>) von Stamm HxN1	
γ -fw: <u>CGGATCCT</u> CTACATGCAAAGAGTGTC	BamHI
γ -rev: GCCAAGCTTCTAATGCGCTTTTGCTGTTC	HindIII
Überexpression der Aktivase (<i>masG</i>) von Stamm HxN1	
Ac-fw: AATAAGCTTCCATCGTCCGTGCCATCGCCAA	HindIII
Ac-rev: CGAGATCTTCAGTCAGACCGTTTGTCAGT	BglII

Material und Methoden

Fortsetzung Tab 5: Verwendete Primer

Zielgen	Restriktions-
Sequenz (5' → 3')	schnittstelle
<hr/>	
Überexpression des <i>masCDE</i> -Konstrukts von Stamm HxN1	
γ -Untereinheit mit zusätzlicher Ribosomenbindungsstelle	
γ RBS-fw: GCGCATATGTCTACATGCAAAGAGTGTGC	Ndel
γ RBS-rev: CCGCATATGTATATCTCCTTCGCGGTCAATGCGCTTTTGCTGTTCTG GTATTTCCAGAT	Ndel
α - und β -Untereinheit	
$\alpha\beta$ -fw: CGGATCCACTGCAACTTCAACTATC	BamHI
$\alpha\beta$ -rev: TGTGCGGCCGCCTAACCTTCGGCCAAGTTTTCGA	NotI
<hr/>	
Sondenprimer Stamm OcN1(<i>masD</i>)	
43-fw: T(TA)(CT)GA(GC)GA(GT)AAGAAGTACAC	
44-rev: (AC)(AC)GTTGAACTGIA(CT)(AG)TG(AG)TC	
<hr/>	
Primer zum Lückenschluss zwischen OcN1 Shotgun-Klonen (an Fosmid-DNA und genomischer DNA)	
137-fw: ACGCGTATGGTTCAGATGGT	
138-rev: GTTGCAAGCATCGGTACCAT	
<hr/>	
Primer für das <i>masD</i> -Gen in Stamm Pnd3	
213-fw: AATGGTGGTGG(AG)T(GC)GC(GT)GAA	
214-rev: AAAGTG(GT)GCGCTGTA(AGT)CC(AGC)G	
249-fw: TCCGGCTTTGAAGACGCAAA	
244-rev: AGGGCGTATTCCACCATCTT	
246-fw: CTCGGCCGTTTTGAAATCCT	
250-rev: GATTCCAATCCGTGTTCCG	
<hr/>	
Primer für das <i>masD</i> -Gen in Stamm TD3	
213-fw: siehe Primer für Pnd3	
214-rev: siehe Primer für Pnd3	
<hr/>	
Primer zur Unterscheidung von Alkan- und Aromaten-Abbauern im <i>mas</i> - bzw. <i>bss</i> -Gen, allgemeine Screening-Primer	
159-fw: TGAAG(TG)TGGTCTTGAGGCG (Alkan-Abbauer)	
147-rev: TCA AGC GCA TCG A(CT)G A(GC)T TG (Alkan-Abbauer)	
148-fw: TGG GTC AAC GTG CTG TGC AT (Aromaten-Abbauer)	
149-rev: TCC TCG (AT)(AG)(AG) CCT TCC CAG TT (Aromaten-Abbauer)	
150-fw: CC(AGC) AA(AG) TGG GG(CT) AA(CT) GA(CT) GA	
151-rev: TTG AAC TG(AGC) A(CT)(AG) TG(AG) TC(AG) AT	

Primer für die Sequenzierung des OcN1-Fosmid-Klons, zur Sequenzierung der PCR-Produkte, sowie generelle Vektor-Sequenzierprimer sind im Anhang (Kapitel G) aufgeführt. Abb.7 zeigt eine Übersicht über die Bindungsstellen einzelner Primer, die zur Ermittlung der *mas*-Gensequenz eingesetzt wurden.

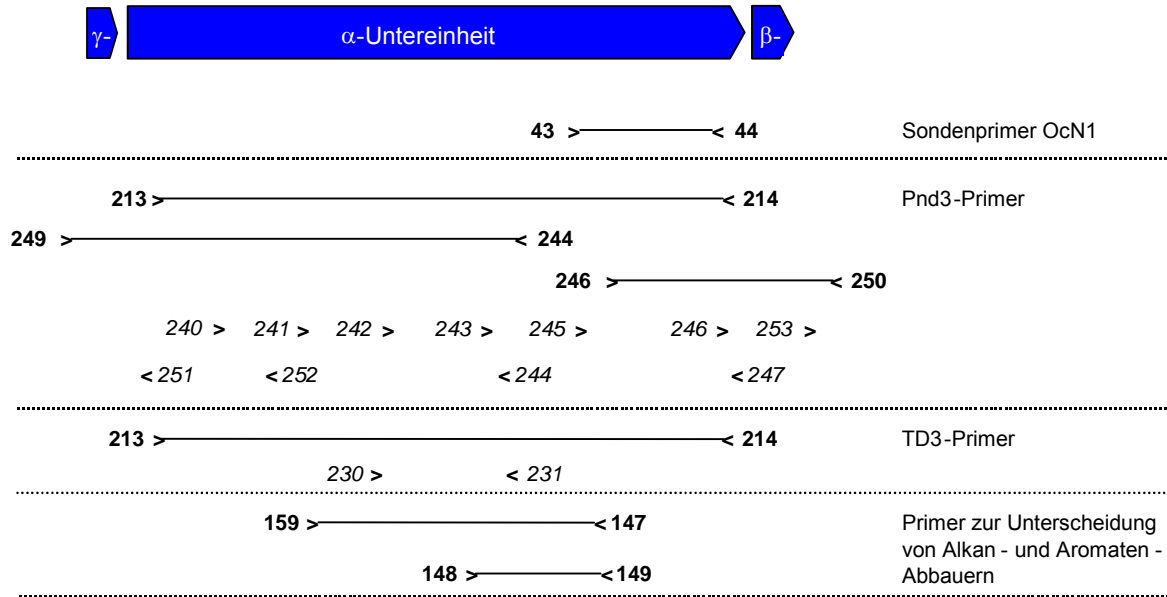


Abbildung 7: Zielregion der Primer zur *mas*-Gen Identifizierung in verschiedenen Stämmen. Primer, die zur Amplifizierung von PCR-Produkten eingesetzt wurden, sind fett dargestellt, kursiv gedruckte Primer wurden zur Sequenzierung eingesetzt (> forward-Primer; < reverse-Primer).

3.2. Plasmidkonstrukte zur heterologen Expression

Die α -, β - und γ -Untereinheit der Methylalkylsuccinat-Synthase von HxN1, sowie das *masCDE*-Konstrukt wurden in dem pET-42a-c(+)-Vektor überexprimiert. Die Konstrukte sind N-terminal mit dem Glutathion-S-Transferase –Tag (GST-Tag) verbunden, über den auch die Reinigung erfolgte. Bei dem *masCDE*-Konstrukt besitzt nur die α -Untereinheit N-terminal den GST-Tag, die beiden anderen Untereinheiten verblieben ohne Tag. Dafür wurde zunächst die γ -Untereinheit (*masC*) mit einer zusätzlichen Ribosomenbindungsstelle von *E.coli* über zwei NdeI-Schnittstellen oberhalb des GST-Tags in den Vektor eingebracht. Anschließend wurde ein weiteres Konstrukt, bestehend aus der α - (*masD*) und der β -Untereinheit (*masE*), in frame unterhalb zum GST-Tag kloniert. Durch den Erhalt der intergenen Region zwischen *masD* und *masE* wird für die

Translation der β -Untereinheit die Ribosomenbindungsstelle von Stamm HxN1 genutzt. Die Aktivase wurde in den pT7-SBP-2 Expressionsvektor kloniert und besitzt, ebenfalls N-terminal, einen Streptavidin-Bindungs-Peptid-Tag (SBP-Tag), eine Weiterentwicklung des Strep-Tag.



Abbildung 8: Konstrukt zur Überexpression der drei *mas*-Untereinheiten im pET 42 a-c(+)-Vektor
Die Primer sind analog zu Tabelle 5 benannt.

3.3. DNA-Isolierung

3.3.1. Isolierung von chromosomaler DNA

Zur Gewinnung von chromosomaler DNA wurden die Zellen zunächst pelletiert und im Verhältnis 1:2 (Pellet : Puffer) in B1-Puffer (50 mM Na₂EDTA; 50 mM Tris basisch; 0,5% Tween-20; 0,5% Triton X-100; pH 8,0) mit 200 µg/ml RNase A resuspendiert. Anschließend wurden Lysozym und Proteinase K in einer Endkonzentration von 5 mg/ml bzw. 2 mg/ml zugesetzt und der Ansatz für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Deprotonierung der DNA wurde zu der Lösung 1/3 (v/v) Puffer B2 (3M Guanidin HCl; 20% Tween-20) hinzugegeben und der Gesamtansatz ca. eine Stunde bei 50°C gehalten. Danach wurde die DNA mittels Isopropanol (1:1 (v/v)) gefällt, auf einen Glasstab aufgewickelt, in 1-fach TE-Puffer (10 mM Tris; 1 mM Na₂EDTA; pH 8,0) überführt und durch mehrmalige Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) Extraktion weiter gereinigt. Nach der letzten Extraktion wurde die wässrige Phase durch Zugabe von Natrium-Acetat (Endkonzentration 0,3 M) angesäuert und die DNA erneut mit Isopropanol gefällt. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (5000 rpm; 1 h; 4°C) das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und die DNA anschließend bei 60°C in H₂O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Bei der Isolation von Sulfatreduzierer-DNA wurde die DNA nach der ersten Fällung nicht auf einen Glasstab aufgewickelt, sondern über Zentrifugation (5000 rpm, 1h, 4°C) pelletiert und in 1-fach TE Puffer resuspendiert. Alle weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

3.3.2. Isolierung von Plasmid DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei größerem Kulturvolumen erfolgte eine Isolierung der Plasmide basierend auf den Pufferzusammensetzungen des Kits für Resuspensions-, Lysis- und Deprotonierungspuffer. Als abschließender Reinigungsschritt wurde eine Isopropanolfällung durchgeführt und die Plasmid-DNA mit 70% Ethanol gewaschen. Die Lagerung der Plasmide erfolgte bei - 20°C bzw. 4°C.

3.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Vervielfältigung von Genen, zur Überexpression und zur Kontrolle von klonierten DNA-Fragmenten eingesetzt. Die Reaktionen wurden in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt.

Tabelle 6: Pipettierschema in der PCR-Reaktion

Zusatz	Volumen (µl)	Endkonzentration
Reaktionspuffer, 10-fach	1,5	1-fach
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5	0,34 mM
Primer 1 (10 µM)	1,0	0,67 µM
Primer 2 (10 µM)	1,0	0,67 µM
Taq-Polymerase	1,0	~ 1U
DNA		1,5-10 ng/µl
H ₂ O	ad 15	

Als DNA-Material wurde sowohl gereinigte chromosomale DNA oder Plasmid-DNA als auch direkt Koloniematerial („whole cell PCR“) eingesetzt. Bei größeren Ansätzen (bis zu 50 µl) wurden die eingesetzten Mengen entsprechend angepasst.

Für die Überexpression verschiedener Gene wurden sogenannte „proofreading Polymerasen“ (High Fidelity Polymerase, Roche Diagnostics, Mannheim bzw. 9° North, NEB, Frankfurt) verwendet, die durch ihre Exonuklease-Aktivität eine geringere Fehlerrate beim Nukleotideinbau als die Taq-Polymerase aufweisen. Für diese PCR-Reaktionen wurden die Protokolle der Firmen angewendet.

Die PCR wurde in Thermocyclern (Eppendorf, Hamburg) nach folgendem Standardprogramm durchgeführt.

1	Initiale Denaturierung	94°C	2 – 10 min
2	Denaturierung	94°C	0,5 min
3	Annealing (Hybridisierung)	48 - 56°C	0,5 min
4	Elongation	68 - 72°C	0,5 – 6 min
5	Finale Elongation	72°C	5 min
6	Standtemperatur	20°C	∞

Die Amplifikation der PCR-Produkte erfolgte in der Regel in 30 Zyklen (Wiederholung Schritt 2-4). Die geeignete Hybridisierungstemperatur wurde experimentell ermittelt; die Elongationszeit und -temperatur richtete sich nach der Produktgröße und der Prozessivität der verwendeten Polymerase.

3.5. Reinigung und Sequenzierung von PCR-Produkten

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes zur Kontrolle auf einem Agarosegel (1% (w/v); NEEO Agarose, Roth, Karlsruhe) analysiert. Die Reinigung des verbleibenden Reaktionsansatzes erfolgte mit dem Qiaquick PCR-Purification-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Alternativ wurde die gesamte PCR-Reaktion über ein Agarosegel aufgetrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und über das Qiaquick Gel-Extraction-Kit (Quiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.5.1. Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden

Die PCR-Produkte und Plasmidkonstrukte wurden mit einem ABI-PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Darmstadt) sequenziert. Durch den Einbau von verschiedenen fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (ddCTP, ddATP, ddGTP, ddTTP) werden in der Sequenzierungs-PCR unterschiedlich lange Einzelstrang-DNA-Moleküle gebildet. Diese werden in dem Kapillarsequenzierer chromatographisch aufgetrennt und die endständigen Farbstoffe detektiert, so dass die Nukleotidsequenz

ermittelt werden kann. Zur Sequenzierung wurde das BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet.

Tabelle 7: Pipettierschema in der Sequenzierungs-PCR

Zusatz	Volumen	Endkonzentration
BigDye Reaktionspuffer	1,5 µl	1-fach
Primer (5 µM)	1,0 µl	1 µM
BigDye-Lsg	1,0 µl	
DNA	2,0 µl	5-20 ng/µl

Für die PCR wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

1 Initiale Denaturierung	96°C	20 sek
2 Denaturierung	96°C	10 sek
3 Annealing	53°C	5 sek
4 Elongation	60°C	4 min
5 Standtemperatur	15°C	∞

Für die Sequenzierungs-PCR wurden 40 Amplifikationszyklen (Schritt 2 bis 4) verwendet. Die Reinigung erfolgte über Sephadex G-50 Superfine (GE Healthcare, München) Material. Dafür wurden 45 µl des Sephadex in MultiScreen Platten (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) drei Stunden bei Raumtemperatur mit 300 µl H₂O gequollen, abzentrifugiert (5 min, 910 g) und mit 150 µl H₂O gewaschen. Auf das vorbereitete Sephadex-Material wurde die verdünnte Sequenzierungs-PCR (5 µl PCR-Ansatz + 10 µl H₂O) aufgetragen und ebenfalls zentrifugiert.

Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit dem DNASTAR Lasergene Modul Seqman (GATC, Konstanz).

3.5.2. Sequenzierung von Fosmid Klonen

Die Sequenzierung des OcN1-Fosmid Klons wurde von GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde aus dem Fosmid-Klon eine Shotgun Bibliothek erstellt und die Shotgun-Klone mit einer 2-fachen Abdeckung ansequenziert. Der Lückenschluss zwischen den einzelnen Shotgun-Klonen bis zum Single-Contig und

die Sequenzierung bis zu einer 4-fachen Abdeckung erfolgte über Primerwalking nach dem Sequenzierungsprotokoll für Plasmide in dieser Arbeit. Die Analyse der Sequenzdaten wurde mit dem DNASTAR Lasergene Modul Seqman durchgeführt. Die Isolierung der Fosmid-DNA erfolgte über das Qiagen Large-Construct Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben.

3.6. Restriktion

Die DNA-Fragmente wurden mittels Restriktionsenzymen gemäß den Angaben des Herstellers gespalten. Ein Verdau mit zwei verschiedenen Enzymen wurde soweit wie möglich in dem empfohlenen Puffersystem für einen Doppelverdau (2-fach Tango Puffer, Fermentas) durchgeführt bzw. die Konzentrationen der Enzyme den geänderten Pufferbedingungen angepasst. Wenn dies nicht möglich war, wurden die Restriktionsansätze nach dem ersten Einzelverdau über das Qiaquick PCR-Purification-Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt und anschließend erfolgte der Verdau mit dem zweiten Restriktionsenzym unter neuen Pufferbedingungen.

Die Inkubationszeit für die Restriktion betrug in der Regel eine Stunde bei 37°C. Die Reaktion wurde entweder durch Hitzeinaktivierung (20 min bei 65°C bzw. 80°C) oder durch Reinigung mittels des Qiaquick PCR-Purification-Kit (Qiagen, Hilden) gestoppt. Verdaute Plasmid-DNA wurde über ein Agarosegel gereinigt.

3.7. Ligation von Plasmid- und Insert-DNA

Die Ligrationsreaktion erfolgte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in einem Volumen von 15 µl bei 4°C über Nacht. Dabei wurden Plasmid- und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:1 bzw. 1:3 zugesetzt. Als Ligase wurde die T4-DNA-Ligase von Fermentas verwendet.

Tabelle 8: Pipettierschema für einen Ligationsansatz

Zusatz	Volumen (μ l)	Endkonzentration
10-fach Ligasepuffer	1,5	1-fach
Plasmid-DNA	-	ca. 10 ng/ μ l
Insert-DNA	-	entsprechend des molaren Verhältnisses
T4-DNA-Ligase	1,0	0,34 U/ μ l
ATP (90 mM)	1,0	6 mM
H ₂ O	ad 15	

Der Ligationsansatz wurde direkt zur Transformation von chemisch kompetenten Zellen verwendet.

3.8. Transformation von *Escherichia coli*

Es wurden 50–100 μ l chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen (Top 10 oder BL21(DE3); Invitrogen, Karlsruhe) aufgetaut und mit 10 μ l Transformationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (1 min bei 42°C) wurde der Ansatz erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 400-450 μ l LB-Medium wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend auf selektiven LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Gewachsene Kolonien wurden mittels PCR auf das richtige Insert untersucht.

3.8.1. Klonierung- und Transformation mittels TA-Klonierung

Für Screeningprozesse und „back-up“-Klonierungen wurden bei der Erstellung des *masCDE*-Konstrukts einige amplifizierte PCR-Produkte zunächst über das TOPO TA-Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) in den pCR4-TOPO Vektor eingebracht und anschließend in *E.coli* TOO 10-Zellen transformiert. Die Ligation und Transformation erfolgte nach Herstellerangaben. Bei der Verwendung von Polymerasen, die keine A-Überhänge in der PCR erzeugen, wurde das PCR-Produkt nach der Reinigung für 20 min bei Raumtemperatur unter Zusatz von 2 μ l dATP (100 mM) und 2 μ l Taq-Polymerase (1U/ μ l) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz über das Qiaquick PCR-

Purification Kit aufgereinigt und für die TA-Klonierung eingesetzt. Die Screening-PCR erfolgte dabei mit M13 fw /M13 rev Primern.

3.9. Erstellen von Fosmid-Bibliotheken

Von den Stämmen OcN1 und *Desulfothermus naphthae* wurden für das Screening nach den *mas*-Genen und der Aktivase-Nukleotidsequenz Fosmid-Bibliotheken erstellt. Die Insertgröße bei Fosmid-Libraries liegt bei ca. 40 kb, so dass größere, zusammenhängende Bereiche auf der chromosomalen DNA untersucht werden können. Die DNA beider Stämme wurde wie unter Abschnitt 3.3.1 beschrieben isoliert und ca. 20 µg (OcN1) bzw. 4 µg (TD3) an DNA für die Bibliothek eingesetzt. Zur Herstellung wurde das CopyControl Fosmid Library Production Kits (Epicentre, Madison, Wisconsin, USA) verwendet. Die Größenselektion der DNA-Fragmente erfolgte über eine Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Als Startbedingungen für die Elektrophorese waren dabei eine Spannung von 6 Volt und ein Winkel von 120° eingestellt. Der Puls betrug zu Beginn 1, am Ende 10 bei einer Laufzeit von 16 Stunden. Zur weiteren Verwendung wurden DNA-Fragmente mit einer Größe von ca. 40 kb ausgeschnitten und 4 mal 30 min in 1-fach TE-Puffer pH 8,0 umgepuffert, alle weiteren Arbeitsschritte wurden nach Herstellerangaben ausgeführt. Abweichend zu den Herstelleranweisungen wurde die DNA in den Zwischenschritten nicht durch Fällung präzipitiert, sondern über Microcon-100 Filter (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) aufkonzentriert. Die erzielten Fosmid-Klone wurden in LB-Medium gepoolt, pelletiert und unter Zusatz von 25% Glycerin in LB-Medium mit Chloramphenicol (12,5 µg/mL) resuspendiert. Die Lagerung der Bibliothek erfolgte bei -80°C.

3.10. Koloniehybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

DNA-Transfer

Das Screening der Fosmid-Klone (siehe Material und Methoden 3.10) mittels Koloniehybridisierung wurde nach Grunstein und Hogness (1975) modifiziert. Hierzu wurden die Fosmid-Klone auf 150 x 20 mm-LB-Platten mit Chloramphenicol ausplattiert (ca. 1500 Kolonien/Platte) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien auf einen Nylonfilter (Hybond-N+, GE Healthcare, München) transferiert. Zur

Lyse der Zellen wurde der Filter mit der Kolonie-behafteten Seite nach oben für drei min auf mit 10% SDS-Lösung getränktem Whatman-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) inkubiert. Anschließend wurde die Membran zum Denaturieren für drei min auf 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH getränktes Whatman-Papier gelegt und dann auf Whatman-Papier mit 1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl pH 7,4 für 5 min neutralisiert. Abschließend erfolgte eine 5-minütige Inkubation auf mit 2-fach SSPE (20 mM NaH₂PO₄; 0,3 M NaCl; 2 mM Na₂EDTA) getränktem Whatman-Papier. Die DNA wurde durch UV-crosslinking (2 x 0,125 Joule) kovalent an den Filter gebunden und mit Sonden hybridisiert.

Herstellung der Sonde

Als Sonde diente ein ca. 500 bp PCR-Fragment, dass aus der α -Untereinheit des Radikalenzym amplifiziert werden konnte. Das Fragment wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und mittels des HexaLabel DNA Labeling Kits (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben mit [α -³³P]-dATP radioaktiv markiert. Die Reinigung der Sonde erfolgte über MicroSpin G-25 Säulen (GE Healthcare, München). Zur Denaturierung wurde die Sonde für 10 min bei 95°C gehalten und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Lagerung der Sonde erfolgte bei 4°C.

Hybridisierung

Die Nylonfilter mit Fosmid-DNA wurden für zwei Stunden in Church-Puffer (1 mM Na₂EDTA; 250 mM NaPO₄ pH 7,4; 7% SDS; 1% BSA) im Hybridisierungssofen (Biometra, Göttingen) bei 65°C prähybridisiert. Anschließend wurde die markierte Sonde zugegeben und die Filter über Nacht bei 65°C mit der Sonde hybridisiert. Die Filter wurden zweimal für 30 min in Waschpuffer (0,1% SDS; 0,1-fach SSC; SSC-Puffer: 150 mM NaCl; 15 mM Na₃-Citrat) gewaschen und das Signal mit einem Storage Phosphor Screen aufgezeichnet. Der Screen wurde dann über einen Typhoon Scanner (alles GE Healthcare, München) im „Storage Phosphor“ Modus ausgelesen. Positive Kolonien, die mit der Sonde hybridisierten, wurden auf der Originalplatte identifiziert und im Anschluss ihre DNA sequenziert.

4. Biochemische Methoden

4.1. Überexpression in *Escherichia coli*

Für die Überexpression einzelner Gene (siehe Material und Methoden 4.1) wurden die Plasmidkonstrukte frisch in *E.coli* transformiert und eine Vorkultur in LB-Flüssigmedium mit Antibiotikum angezogen. Mit 500 µl der gewachsenen Vorkultur wurden 50 ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ 0,6–0,8 wurde die Transkription der Gene durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach dreistündigem Wachstum bei 37°C, 180 rpm wurde die Kultur durch Zentrifugation pelletiert und das Pellet bis zur Reinigung der rekombinanten Proteine bei -20°C gelagert. Zur Überwachung der Proteinexpression wurden während des Versuchsverlaufs Proben genommen und mittels SDS-PAGE analysiert.

4.2. Reinigung rekombinanter Proteine

Die eingefrorenen Zellpellets aus der Überexpression wurden aufgetaut und 1:1 (v/v) in eiskaltem PBS-Puffer (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄) resuspendiert. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in drei Zyklen (45 Sekunden; 40 Cycle; 50% Power) mittels Ultraschallsonde (SonoPuls 70, Bandelin, Berlin) aufgeschlossen. Alternativ wurde Lysozym in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugesetzt und die Suspension für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand nach der Zentrifugation (20 min; 13000 rpm; 4°C) wurde für die Proteinreinigung eingesetzt. Alle Reinigungsschritte wurden aerob bei Raumtemperatur durchgeführt.

4.2.1. GST-Affinitätschromatographie

Der Überstand der drei einzeln überexprimierten Untereinheiten sowie des MasCDE-Konstrukts wurde auf eine 1 ml GSTrap HP-Säule (GE Healthcare, München) aufgetragen, die zuvor mit dem fünffachen Säulenvolumen PBS-Puffer equilibriert wurde. Im Anschluss wurde die Säule mit zehn Säulenvolumen PBS-Puffer gewaschen, bevor durch das Anlegen von zehn Säulenvolumen Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion in 500 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0) das Protein mit GST-Tag eluiert wurde.

Die Elutionsfraktionen wurden über SDS-PAGE und Western-Blot Analyse auf das richtige Protein überprüft. In allen Reinigungsschritten betrug die Flussrate 1 ml/min. Nach der Elution wurde die Säule in 20% Ethanol bei 4°C gelagert.

4.2.2. Strep-Tactin-Affinitätschromatographie

Für die Reinigung der Aktivase (MasG) mit dem SRB-Tag wurde eine 2,5 ml Säule mit Strep-Tactin-Sepharose nach Herstellerangaben (IBA BioTAGnology, Göttingen) gegossen. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumen Grundpuffer (100 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl) equilibriert und 2 ml Überstand auf die Säule gegeben. Nachdem der Zellextrakt komplett in das Säulenmaterial eingedrungen war, wurde die Säule mit fünf Säulenvolumen Grundpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Aktivase mit drei Säulenvolumen Grundpuffer, der mit 2,5 mM Desthiobiotin versetzt war, eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden dann über SDS-PAGE und Western-Blot Analyse auf das richtige Protein überprüft. Zur Regeneration der Säule wurde nach der Elution so lange mit Grundpuffer mit 1 mM HABA (Hydroxy-Azophenyl-Benzoesäure) gewaschen, bis die Säule deutlich rot gefärbt war. Abschließend wurde die Säule bis zur Farblosigkeit wieder in den Grundpuffer gesetzt und bei 4°C gelagert.

4.3. Gewinnung von Antikörpern

Die Antikörper gegen die α -, β - und γ -Untereinheit wurden nach der Standardprozedur von Pineda Antikörperservice (Berlin) hergestellt. Die heterolog exprimierten Proteine wurden aerob aufgereinigt (siehe Material und Methoden 4.2) und ohne Abspaltung des Tags für die Immunisierung eingesetzt. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug ca. 1 mg/ml. Für jeden Antikörper wurden zwei Kaninchen mit dem entsprechenden Protein immunisiert und nach 60 Tagen die Serumproben erstmals getestet. Für die β - und γ -Untereinheit war die Immunantwort zu diesem Zeitpunkt bereits ausreichend, für die α -Untereinheit wurde das Immunisierungsprotokoll auf 90 Tage verlängert.

4.4. Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte photometrisch mit dem Bio-Rad-Protein-Assay (Biorad, München) basierend auf der Methode von Bradford (1976). Es wurden 800 µl der (verdünnten) Probe bzw. Standardlsg. mit 200 µl Coomassie Brilliant Blue G-250-Farbreagenz gemischt und die Probe 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration in den Proben wurde anhand einer Standardkurve mit Rinderserumalbumin ermittelt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.5. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht eine Auftrennung der Proteine allein nach ihrer Größe, wobei die Eigenladung der Proteine durch SDS-Zugabe maskiert wird.

Zur Vorbereitung wurden 18 µl Probe (Proteinkonzentration ca. 1,5 µg/µl) mit 6 µl 4-fach SDS-Probenpuffer (1M Tris-HCl, pH 6,8; 40% (v/v) Glycerol; 1% (v/v) einer einprozentigen Bromphenolblaulsg.; 10% (v/v) β-Mercaptoethanol, 8% (w/v) SDS) versetzt und 10 min bei 99°C (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Proben mit geringeren Proteinkonzentrationen wurden zunächst über Acetonfällung aufkonzentriert.

Tabelle 9: Zusammensetzung der SDS-Gele (10 x 7,5 cm)

	Trenngel			Sammelgel
	10%	12%	15%	
H ₂ O (ml)	4,17	3,50	2,50	2,83
4-fach Puffer* (ml)	2,50	2,50	2,50	1,50
Acrylamidlsg. (30%) (ml)	3,33	4,00	5,00	0,67
Ammoniumpersulfat (APS, 10%) (µl)	50	50	50	30
Tetramethylethylendiamin TEMED (µl)	5	5	5	3

* Trenngelpuffer (4-fach): 1,5 M Tris pH 8,8; 0,4% SDS

Sammelgelpuffer (4-fach): 0,5M Tris pH 6,8; 0,4% SDS

Das fertige Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet und für ca. eine Stunde auspolymerisiert. Anschließend wurde das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel mit Taschenkamm hinzugefügt. Bei größeren Gelen (20 x 20 cm) wurden die Volumen aller Lösungen entsprechend angepasst.

Die Analysebedingungen für die Gele betragen 150 V mit einem 200 mM Glycin; 25 mM Tris Base; 0,1% SDS Laufpuffer für ca. 1,5 Stunden. Die Gele wurden in Coomassie R250-Lösung (2,5 g/l Coomassie R250; 400 ml/l Ethanol; 100 ml/l Eisessig, filtriert) gefärbt. Zum Entfärben wurde 20% Ethanol verwendet.

4.6. Identifizierung von Proteinen über Peptidmassen-Fingerprint (PMFP)

Zum Färben von SDS-PAGE Gelen die zur Identifizierung von Proteinen eingesetzt werden sollten wurde folgendes Färbeprotokoll angewendet:

Tabelle 10: Färbeprotokoll für SDS-PAGE Gele mit Coomassie G250 für PMFP

Schritt	Lösung	Inkubationszeit
Fixierung	50% Methanol 2% H ₃ PO ₄ (85%)	über Nacht
Waschen	H ₂ O	3 x 30 min
Inkubation	34% Methanol 2% H ₃ PO ₄ (85%) 17% (NH ₄) ₂ SO ₄	1 h
Färbung	Inkubationslsg. + 0,066% Coomassie G250	mind. 2 Tage
Waschen	25% Methanol	bis zu 1 h
Lagerung	H ₂ O	

Proteinbanden von Interesse wurden ausgestochen und zur PMFP-Analyse zu der Firma Toplab (Martinsried) geschickt.

4.7. Tricin-PAGE

Zur Auftrennung kleiner Proteine wurde ein 16,5% Tris-Tricin-Gel (BioRad, München) verwendet. Die Probenvorbereitung verlief analog zur SDS-PAGE. Als Laufpuffer in der Elektrophorese wurde ein 0,1 M Tris, pH 8,25; 0,1 M Tricin; 0,1% SDS-Puffer eingesetzt, die Spannung betrug 120 V bei einer Laufzeit von 1,5 Stunden.

4.8. Acetonfällung von Proteinen

Zur Fällung der Proteine wurde zu der Proteinlösung das fünffache Volumen an eiskaltem Aceton (-20°C vorgekühlt) zugegeben und das Gemisch für eine Stunde bei -20°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 14 000 g in einer Tischzentrifuge. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für ca. 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde das Pellet, abhängig von der weiteren Verwendung, in einem entsprechenden Puffer gelöst und bei -20°C eingefroren.

4.9. Western-Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden über eine Nassblot-Apparatur (Mini Trans-Blot Zelle, Biorad, München) für 1 Stunde bei 100V in einem Transferpuffer (4,8 mM Tris base, 3,9 mM Glycerin, 0,0375% (w/v) SDS und 20% (v/v) Methanol) auf eine Nitrocellulose-Membran (Optitran BA-S 83, Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen. Beim Blotten kleiner Proteine (<10 kDa) wurde die Blotzeit auf 45 min verkürzt. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran mit Ponceau-Rot (0,5% (w/v) Ponceau S; 1% (v/v) Essigsäure in H₂O) reversibel gefärbt. Die Membranen wurden zur weiteren Verwendung in destilliertem H₂O gelagert.

Immunnachweis

a) Streptavidin-Bindungs-Peptid-Tag (SBP-Tag)

Zur Detektion der rekombinanten Aktivase mit SBP-Tag wurde das Strep-Tag HRP Detection Kit von IBA BioTAGnology (Göttingen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

b) GST-Tag/ Mas-Antikörper

Zur Überprüfung der Expression der rekombinanten α -, β - und γ -Untereinheit mit GST-Tag, sowie bei der Detektion der drei Untereinheiten mit den neu generierten Antikörpern wurde folgendes Protokoll angewendet:

Blocken unspezifischer Bindungsstellen

Zum Blocken wurde die Membran für zwei Stunden in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl) inkubiert.

Inkubation mit primärem Antikörper

Der primäre Antikörper wurde in entsprechender Verdünnung (siehe Tab.11) in Magermilchlösung zugesetzt und die Membran für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert. Alle verwendeten Erst-Antikörper waren unmarkiert.

Waschen

Die Membran wurde dreimal 10 min mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TTBS (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,5 ml/l Tween 20) gewaschen. Im Anschluss wurde sie nochmals 5 min in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS geschwenkt.

Inkubation mit sekundärem Antikörper

Als Zweit-Antikörper wurden Antikörper verwendet, die sich gegen Wirts-spezifische Epitope des primären Antikörpers richteten. Die Markierung erfolgte zum einen über alkalische Phosphatase, zum anderen über Meerrettich Peroxidase. Der sekundäre Antikörper wurde in Magermilchlösung zugesetzt, die Membran darin für 45 min inkubiert und anschließend mit TBS kurz gewaschen.

Detektion

a) alkalische Phosphatase

Die Detektion erfolgte mit NBT/BCIP Tabletten (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Herstellerangaben. Die Detektionszeit betrug 2-10 min, solange bis Banden zu erkennen waren.

b) Meerrettich Peroxidase

Als Substrat für die Peroxidase wurde das SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit von Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA nach Herstellerangaben eingesetzt. Nach der Inkubationszeit wurde überschüssiges Substrat von der Membran entfernt und die Membran in Klarsichtfolie eingeschlagen. In einer Autoradiographiekassette wurde ein CL-X Posure Film (Pierce Biotechnology) auf der eingeschlagenen Membran exponiert und anschließend mit GBX-Entwickler und Fixierer (beides Sigma-Aldrich, Taufkirchen) entwickelt. Die Entwicklungszeit betrug dabei zwischen einer und dreißig Minuten und wurde für jede Anwendung experimentell ermittelt.

Tabelle 11: Verwendete Antikörper und Antiseren

1) Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
GST-Tag-monoclonal antibody mouse (Novagen, Darmstadt)	1:10000	Goat anti mouse-alkaline phosphatase (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	1:2000

2) Antiseren

Primäres Antiserum	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
Anti- α Untereinheit (diese Arbeit)	1:10000	Goat anti rabbit-alkaline phosphatase (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	1:2000
	bzw. 1:20000	Goat anti rabbit peroxidase conjugated (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA)	1:20000
Anti- β Untereinheit (diese Arbeit)	1:2000	Goat anti rabbit-alkaline phosphatase (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	1:2000
		Goat anti rabbit peroxidase conjugated (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA)	1:20000
Anti- γ Untereinheit (diese Arbeit)	1:2000	Goat anti rabbit-alkaline phosphatase (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)	1:2000
		Goat anti rabbit peroxidase conjugated (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA)	1:20000

4.10. Bestimmung der Methylalkylsuccinat-Synthase-Aktivität

4.10.1. Enzymtest

Die Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase in HxN1 wurde über den Nachweis des gebildeten Produkts 1-Methylpentylsuccinat aus Hexan und Fumarat mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS, siehe Material und Methoden 4.10.2) bestimmt.

Für den Test wurden frische bzw. bei -20°C / -80°C gelagerte Zellextrakte von HxN1-Kulturen verwendet. Den gepufferten, reduzierten Zellextrakten wurde in der Anaerobenkammer 6% (v/v) Hexan und 40 mM Fumarat zugesetzt und der Ansatz in Serumflaschen mit Butylstopfen bei 28°C in einem Überkopf-Schüttler (Heidolph, Kehlheim) inkubiert. Alternative Substrate, zur Bestimmung des Substratspektrums des Enzyms im Rohextrakt, wurden mit 2% (v/v) zugesetzt, um eventuelle toxische Effekte zu minimieren. Als weitere Vertreter der *n*-Alkane wurden Butan, Pentan, Heptan, Octan, Nonan, Decan, Undecan und Dodecan getestet, als Vertreter der Cycloalkane wurde Cyclohexan eingesetzt. Daneben wurde Toluol als mögliches Substrat getestet. Im Fall von Butan wurde der Enzymassay für 2 min mit dem Gas überspült. Der Reaktionsansatzes wurde über Nacht inkubiert; für Zeitverläufe wurden kontinuierlich Proben entnommen. Die Testansätze nach Chromatographiesäulen enthielten zusätzlich 50 mg/ml BSA, welches zur Stabilisierung des Proteins zugegeben wurde.

4.10.2. Identifikation von 1-Methylpentylsuccinat mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Probenvorbereitung

Ein Volumen von 0,5 ml des Enzymassays (siehe Material und Methoden 4.10.1) wurden durch Zugabe von 20 μl 50%iger Schwefelsäure abgestoppt. Anschließend wurden 50 μl einer 1 mM Sebacinsäurelösung in 200 mM Tris-HCl, pH 8,0 als interner Standard zu jeder Probe zugesetzt. Zur Methylierung der freien Carboxylgruppen wurden 100 μl Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH, 0,25 M in Methanol) verwendet und die Proben für 20 min bei 99°C im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der gebildete Methylester des 1-Methylpentylsuccinats durch Ausschütteln mit 3 ml Hexan extrahiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 3000 rpm, 15°C) wurden 2 ml der Hexanphase abgenommen und in einer Vakuum-Zentrifuge (Concentrator 5301,

Eppendorf, Hamburg) vollständig verdampft. Der Rückstand wurde in 100 µl Hexan aufgenommen und für die GC-MS Analyse eingesetzt.

Gaschromatographie-Massenspektrometrie

1-Methylpentylsuccinat wurde mit einem GCQ Thermo Finnigan MAT (Thermo Scientific Fisher, Bremen) nachgewiesen. Als Trägergas diente Helium. Die chromatographische Trennung der Probenbestandteile erfolgte durch eine OPTIMA 5MS-Kapillarsäule (30 m) mit einer Filmdicke von 0,25 µm (5% Diphenyl – 95% Dimethylpolysiloxan, Macherey-Nagel, Düren). Die Säule wurde mit 1 µl Probe splitless über einen Autosampler beladen, die Injektortemperatur betrug 250°C. In der nachfolgenden Tabelle ist das zur Auftrennung eingesetzte GC-Programm aufgeführt:

Tabelle 12: GC-Programme für die GC/MS

	Rate (°C/min)	Säulentemperatur (°C)	Haltezeit (min)
Initial		130	3,0
Rampe 1	4	175	0,1
Rampe 2	30	280	1,0

Zur Detektion der entstehenden Additionsprodukte bei dem Substratspektrumtest wurde das Programm folgendermaßen geändert:

	Rate (°C/min)	Säulentemperatur (°C)	Haltezeit (min)
Initial		60	3,0
Rampe 1	4	280	1,0

Das MS-Gerät wurde im EI (Elektronenstoß-Ionisation)-Modus gefahren mit einem FullScan, in dem spezifisch positive Ionen mit den Masseneinheiten m/z 60 bis m/z 260 detektiert wurden. Für die Analyse der Spektren wurde die Xcalibur Datenbearbeitungssoftware benutzt.

Die Identifikation von 1-Methylpentylsuccinat erfolgte zum einen über das bekannte Spaltmuster (Rabus *et al.*, 2001) zum anderen mit Hilfe eines synthetisierten Standards von Dimethyl-Methylpentylsuccinat. Der Standard ist nicht kommerziell erhältlich und wurde freundlicherweise an der Fachhochschule Oldenburg Ostfriesland Wilhelmshaven von Frau Dr. Dauelsberg aus 2-Hexylquecksilberchlorid und Maleinsäureanhydrid mit anschließender Veresterung (Giese und Kretzschmar, 1984) angefertigt.

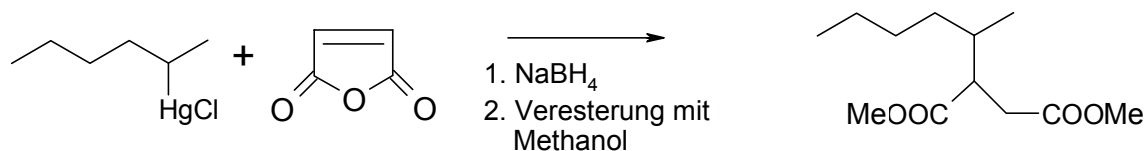


Abbildung 9: Syntheseweg des Dimethyl-Methylpentylsuccinats

4.11. Bestimmung von Nitrat und Nitrit mittels

Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Nitrat und Nitrit im Medium wurden mit einem HPLC-System von Sykam Chromatographie Vertriebs GmbH (Eresing) bestimmt. Die Daten wurden mit der Clarity HPLC Software von DataApex (Prag, Tschechische Republik) aufgenommen und analysiert. Zur Auftrennung der Probenbestandteile wurde zunächst eine Vorsäule eingesetzt, an die eine Anionentauschersäule (IBJ A3, High Speed NO_x, Sykam GmbH) angeschlossen war. Die Säulentemperatur wurde konstant bei 50°C gehalten. Als Laufmittel diente 20 mM NaCl, 45% Ethanol (v/v) bei einer Flussrate von 1 ml/min. Nitrat und Nitrit wurden über einen UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 220 nm nachgewiesen.

Zur Probenvorbereitung wurde die Kultur über einen 0,2 µm Celluloseacetat-Filter (F 30-0,2 CA-S, Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert und der Überstand per Handinjektion über eine 50 µl Probenschleife auf die Säule gegeben.

4.12. Reinigung der Methylalkylsuccinat-Synthase von Stamm HxN1

Die Reinigung der Methylalkylsuccinat-Synthase wurde an einer ÄKTA Explorer-Anlage von GE Healthcare (München) unter strikt anaeroben Bedingungen in einer Anaerobenkammer mit N₂-Atmosphäre bei 7°C durchgeführt. Alle Puffer wurden vor der Anwendung durch Vakuumfiltration über eine Cellulose-Acetat Membran (Filtropur BT50; Porengröße 0,2 µm, Sarstedt) gereinigt. Um ein Ausgasen der Puffer während der Reinigung zu vermeiden wurde ein Degaser (Typ Populaire, SunChrom, Freidrichsdorf) zwischengeschaltet. Als Reduktionsmittel wurden geringe Konzentrationen von Na-Dithionit (0,5-1mM) zugesetzt. Die Langzeitlagerung der Säulen erfolgte in 20% (v/v) Ethanol.

4.12.1. Ionenaustauschchromatographie an ANX-Sepharose

Ein Zellextraktvolumen von 5 ml von anaerob mit Hexan gewachsenen HxN1-Zellen wurde über einen Superloop auf fünf in Reihe geschaltete 5 ml HiTrap ANX FF-Säulen (schwacher Anionentauscher, GE-Healthcare, München) mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgebracht. Als Laufpuffer diente ein 100 mM Tris-HCl Puffer, pH 8 mit 5 mM Fumarat zur Stabilisierung des Proteins, in dem auch die Säulen zuvor equilibriert wurden. Nach dem Auftragen des Zellextrakts wurde die Flussrate auf 3 ml/min erhöht und die Säule mit Laufpuffer (+ 150 mM NaCl) gewaschen, bis das UV_{280nm}-Signal wieder stabil war. Zur Elution der Methylalkylsuccinat-Synthase wurde die NaCl-Konzentration im Laufpuffer auf 250 mM NaCl erhöht. Die bei dieser NaCl-Konzentration in ca. 40 ml eluierenden Proteine wurden mittels Ultrafiltration über eine Zellulose-Membran (Amicon Ultracel 100K, Millipore, Schwalbach) konzentriert. Die Membran wurde vor ihrem Einsatz für 24 Stunden in der Anaerobenkammer entgast und die Zentrifugation erfolgte in speziell angefertigten, mit Butylstopfen verschließbaren Glasgefäßen der Firma Ochs (Bovenden/Lenglern) bei 3000 rpm. Der aufkonzentrierte Extrakt wurde für die weitere Reinigung und für Aktivitätstests eingesetzt. Abschließend wurden die ANX-Säulen mit 5 M NaCl gewaschen und wieder in Laufpuffer gesetzt.

4.12.2. Gelfiltration an Sephadex G 25 zum Umpuffern

Das Konzentrat der ANX-Fractionen wurde zum Umpuffern vor der Hydroxylapatit-Säule auf eine Sephadex G 25-Säule aufgetragen. Als Laufmittel diente ein 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 8,0 mit 5 mM Fumarat und 0,5 mM Dithionit, in dem die Säule zuvor auch equilibriert wurde. Die Flussrate betrug 3 ml/min, die Proteinfractionen wurden für die nächste Säule eingesetzt.

4.12.3. Hydroxylapatit-Chromatographie

Der umgepufferte Proteinextrakt wurde auf eine 2 ml Hydroxylapatit-Säule (CHT2-1, Biorad, München) geladen, die mit dem 50 mM Natriumphosphat-Puffer (Puffer A) von der Gelfiltration equilibriert wurde. Zur Elution wurde ein 200 mM Natriumphosphat-Puffer pH 8,0 mit 5 mM Fumarat und 0,5 mM Dithionit (Puffer B) eingesetzt. Die Säule wurde zunächst mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer (100% Puffer A) gewaschen bis das $\text{UV}_{280\text{nm}}$ -Signal stabil war. Für die Elution der Methylalkylsuccinat-Synthase wurde die Konzentration von Natriumphosphat auf 102 mM (65% Puffer A; 35% Puffer B) erhöht. Die Flussrate betrug 3,5 ml/min. Anschließend wurde die Säule mit 200 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (100% Puffer B) gespült, bis alle Proteine von der Säule gewaschen waren. Die Methylalkylsuccinat-Synthase wurde über den Antikörper gegen die α -Untereinheit detektiert.

4.12.4. Gelfiltration an Superdex 200 zur Molekularmassebestimmung des nativen Enzyms

Die HiLoad 16/60 Superdex 200 prepgrade-Säule (GE-Healthcare, München) wurde mit Standardproteinen aus dem High und Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit (GE-Healthcare, München) kalibriert. Dabei wurde ein Gemisch aus Ribonuklease A (13,7 kDa), Chymotrypsin (25 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Albumin (67 kDa), Aldolase (158 kDa), Catalase (232 kDa), Ferritin (440 kDa) und Thyroglobulin (669 kDa) verwendet. Als Laufmittel diente ein 100 mM Tris-HCl Puffer, pH 8,0 mit 5 mM Fumarat, die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Es wurde eine 2-fach Kalibrierung durchgeführt. Über die Elutionsvolumina (V_e) der jeweiligen Standardproteine wurde der Verteilungskoeffizient (K_{AV} -Wert; $K_{AV} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$) berechnet und eine

Kalibrierungsgerade erstellt. V_o bezeichnet das Ausschlussvolumen der Säule (43,8 ml); V_t das Bettvolumen (110 ml).

Zur Ermittlung der Molekularmasse der nativen Methylalkylsuccinat-Synthase wurden 0,5 ml des konzentrierten ANX-Extraktes auf die Superdex 200 geladen, wobei Laufmittel und Flussrate identisch zum Kalibrationslauf waren. Die Methylalkylsuccinat-Synthase Fraktion wurde mittels des Antikörpers gegen die α -Untereinheit identifiziert und über den K_{AV} –Wert das Molekulargewicht bestimmt.

D Ergebnisse

1. Heterologe Überexpression in *Escherichia coli*

Die in dieser Arbeit erstellten Fusionskonstrukte zur Überexpression in *E.coli* sollten in erster Linie zur Produktion von spezifischen Antikörpern gegen die drei Untereinheiten (α -, MasD; β -, MasE und γ -Untereinheit, MasC) der Methylalkylsuccinat-Synthase eingesetzt werden. Des Weiteren sollten aber auch Aktivierungsversuche der heterolog exprimierten Methylalkylsuccinat-Synthase durchgeführt werden. Für die Herstellung der Fusionsproteine wurden die Gensequenzen mittels PCR amplifiziert, mit Restriktionsenzymen verdaut und in Expressionsvektoren (Methylalkylsuccinat-Synthase und Untereinheiten: pET-42a-c(+) mit GST-Tag; Aktivase: pT7-SBP-2 Vektor mit SBP-Tag) ligiert. Nach der Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* TOP 10-Zellen wurden angewachsene Zellen mittels PCR auf das Vorhandensein des Genkonstruktes gescreent. Positive Kolonien wurden zur Plasmidisolierung im 5 ml Maßstab angezogen. Nach einer anschließenden Kontrollsequenzierung wurden die Plasmide zur Überexpression in den *E.coli* Stamm BL21DE3* transformiert.

Für die auf Affinität basierenden Reinigungssysteme rekombinanter Proteine spielt die Auswahl des Fusions-Tag eine wichtige Rolle. Beide in dieser Arbeit eingesetzte Tags, der GST-Tag und der SBP-Tag, eignen sich gut für die Reinigung unter physiologischen Bedingungen, so dass die Proteinaktivität sowie die Quartärstruktur nicht-kovalenter Proteinkomplexe erhalten werden kann. Zusätzlich besteht bei beiden Tags die Möglichkeit, die Fusionsproteine auch unter anaeroben Bedingungen aufzureinigen, was im Hinblick auf mögliche Aktivitätstests und der Sauerstoffempfindlichkeit der aktivierten Methylalkylsuccinat-Synthase von Vorteil wäre.

Wie oben beschrieben, war aber die Herstellung von Antikörpern der Hauptgrund für diese Überexpressionen. Da die kleinen Untereinheiten der Methylalkylsuccinat-Synthase aufgrund ihrer Größe von 8 kDa (β -Untereinheit) und 7 kDa (γ -Untereinheit) nur eine geringe Immunogenität aufweisen, wurde der GST-Tag für das Fusionsprotein gewählt. Durch seine Größe von 26 kDa wirkt er sich förderlich auf die Immunität kleinerer Proteine aus. Aufgrund der einfachen Handhabung wurde auch die α -Untereinheit mit GST fusioniert. Für die Aktivase wurde der SBP-Tag (4,3 kDa) gewählt, da sie mehrere Fe-S Cluster enthält und der SBP-Tag als unproblematisch bei der

Reinigung in Gegenwart von Metallionen gilt. Alle Proteine wurden N-terminal mit dem jeweiligen Tag fusioniert.

1.1. Überexpression der α -, β - und γ -Untereinheit

Zu Beginn der Arbeit war es noch nicht möglich, die Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase im zellfreien Extrakt zu bestimmen. Für eine Proteinreinigung ist aber eine genaue und schnelle Identifizierung des Zielproteins unabdingbar. Daher wurde die Identifizierung des Proteins mittels Westernblotting als Methode der Wahl angesehen. Um einen spezifischen Nachweis aller drei Untereinheiten über Immunodetektion zu ermöglichen wurden die heterolog exprimierten α -, β - und γ -Untereinheiten zur Antikörperproduktion in Kaninchen verwendet. Die Expression und Reinigung der einzelnen Fusionsproteine wurde mittels SDS-PAGE verfolgt. In Abb. 10 (A und B) ist exemplarisch der Verlauf der Überexpression für die β - und γ - Untereinheit dargestellt. Drei Stunden nach Induktion der Kultur zeigte sich für beide Untereinheiten jeweils ein deutlich überproduziertes Protein mit einer Größe von ca. 38 kDa. Diese Größe stimmt mit der theoretischen Größe, abgeleitet aus den Fusionskonstrukten, überein. Des Weiteren konnte mittels eines spezifischen Anti-GST-Antikörpers gezeigt werden, dass es sich bei den Banden um die Fusionsproteine handelt (Abb. 10, C). Die rekombinante α -Untereinheit konnte ebenfalls im SDS-PAGE Gel an Hand ihrer Größe (ca. 120 kDa) und mittels Western-Blot Analyse identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

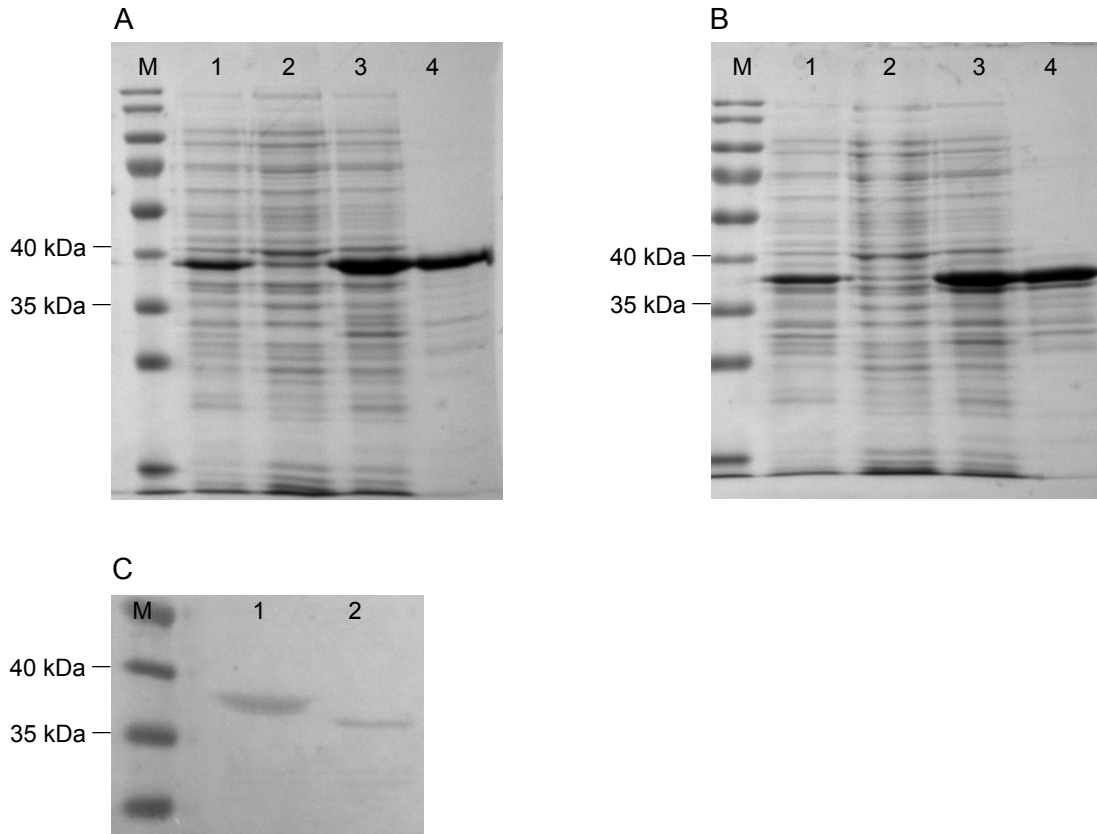


Abbildung 10: Überexpression und Western Blot der β - und γ -Untereinheit (MasE und MasC) von Stamm HxN1

Die Trennung der Proteine erfolgte auf einem 12% SDS-PAGE Gel. A, β -Untereinheit; B, γ -Untereinheit

M, Proteinstandard; 1, *E. coli*-Vorkulturextrakt; 2, *E. coli* Zellextrakt vor der Induktion; 3, *E. coli* Zellextrakt nach der Induktion (3 h); 4, gereinigtes Protein mit GST-Tag

C, Western-Blot mit Anti-GST-Antikörper; 1, β -Untereinheit; 2, γ -Untereinheit

Bei der Reinigung der GST-getaggtten Enzyme mittels Affinitätschromatographie eluierten alle Untereinheiten in einem schmalen Peak (2 ml) von der Säule und zeigten eine genügende Reinheit für eine Immunisierung (siehe Abb. 11). Die aus einer 50 ml *E.coli* Kultur gewonnene Menge an gereinigtem Protein lag bei 1-3 mg. Rückschlüsse auf die Gesamtmenge an Protein im überexprimierten Rohextrakt waren aber nicht möglich, da nur ein geringer Teil der Proteine gelöst vorlag. Ein Großteil des Proteins konnte im SDS-PAGE Gel nach dem Aufschluss in den Zelltrümmern festgestellt werden. Besonders bei der α -Untereinheit war die Proteinkonzentration in der löslichen Fraktion verglichen mit dem Expressionslevel in der induzierten Kultur gering. Um die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen wurden verschiedene Parameter im Protokoll verändert, jedoch brachten weder die Absenkung der Inkubationstemperatur auf 28°C,

noch geänderte Inkubationszeiten nach der Induktion eine Verbesserung der Löslichkeit. Für die weitere Anwendung war die Konzentration an gelöstem Protein jedoch hoch genug, so dass keine weiteren Optimierungen vorgenommen wurden.

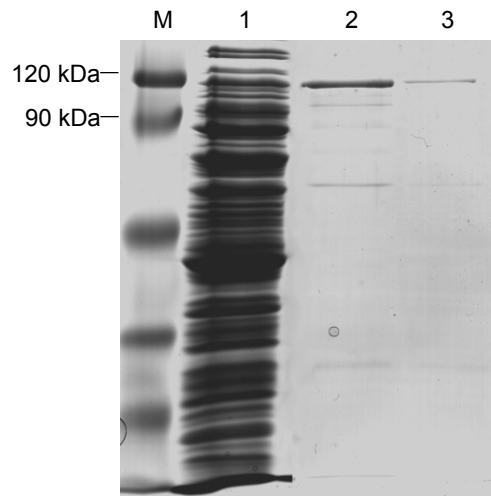


Abbildung 11: Reinigungsfractionen der heterolog exprimierten α -Untereinheit. Die Proteine wurden auf einem 12% SDS-PAGE Gel aufgetrennt. M, Proteinstandard; 1, aufgeschlossener Extrakt *E. coli* mit α -Untereinheit; 2+3, Elutionsfraktionen (3 und 4 ml) der α -Untereinheit

1.1.1. Herstellung der Antikörper

Die gereinigten rekombinanten Proteine der Methylalkylsuccinat-Synthase-Untereinheiten wurden für die Immunisierung der Kaninchen eingesetzt (ca. 500 μ g Protein/Tier). Für alle drei Untereinheiten konnten Antiseren generiert werden, die eine spezifische Detektion der einzelnen Untereinheiten ermöglichen. Die Immunisierung der Tiere erfolgte für 60 Tage (β - und γ -Untereinheit) bzw. 91 Tage (α -Untereinheit). In Abb.12 ist exemplarisch der Immunisierungsverlauf für Tier 1 mit der α -Untereinheit dargestellt. Bereits nach 60 Tagen konnte die Bildung von Antikörpern gegen die α -Untereinheit nachgewiesen werden, jedoch war die Immunantwort nach 91 Tagen deutlich stärker. Die Detektion der Untereinheiten wurde mit Serumverdünnungen von $1:1 \times 10^4$ bis $1:2 \times 10^4$ (anti- α -Untereinheit) und $1:2 \times 10^3$ (anti- β - und anti- γ -Untereinheit) erzielt. Als Negativkontrolle dienten dabei Zellextrakte von auf

Capronat gewachsenen HxN1 Kulturen (nicht gezeigt). Der Antikörper gegen die α -Untereinheit wurde zusätzlich an Zellextrakt des nahe verwandten Stamm OcN1 getestet. In Extrakten von OcN1, die auf Octan gewachsen waren, konnte ebenfalls die mögliche α -Untereinheit der Methylalkylsuccinat-Synthase detektiert werden und dies mit einer ähnlichen Effizienz wie für HxN1 (Bandendetektion bei gleicher Gelbeladung und Antikörperverdünnung) (nicht gezeigt). Weitere Alkanabbauer wurden bisher noch nicht auf Kreuzreaktionen getestet, ebenso wenig, wie die Antikörper gegen die kleinen Untereinheiten.

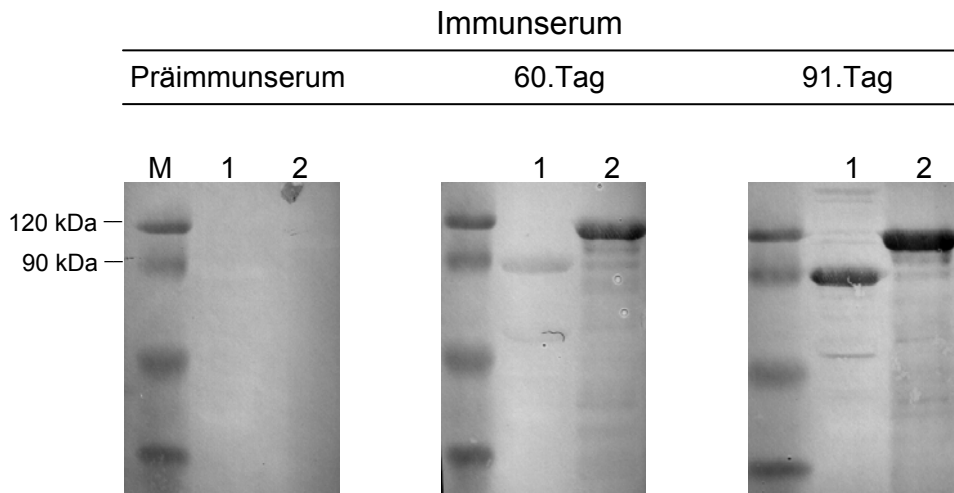


Abbildung 12: Immunisierungsverlauf Tier 1 bei der Herstellung des anti- α -Untereinheit Serums.

Western Blot mit jeweiliger Serumproben nach Separation der Proteine auf einem 12% SDS-PAGE Gel. Das Antiserum wurde 1:3000 verdünnt, der eingesetzte sekundäre Antikörper war mit einer alkalischen Phosphatase markiert. Die Detektion erfolgte mit NBT/BCIP-Tabletten für 2 min. Die erwartete Größe des Fusionsproteins beträgt 120 kDa, die Größe der α -Untereinheit liegt bei 95 kDa.

M, Proteinstandard; 1, Zellextrakt HxN1 (Hexan als Wachstumssubstrat); 2, Zellextrakt *E. coli* mit heterologer α -Untereinheit

1.2. Überexpression des MasCDE-Konstruktes und der Aktivase (MasG)

In Analogie zur Benzyl-Succinat Synthase wird die Methylalkylsuccinat-Synthase wahrscheinlich ebenfalls posttranslational von einer Aktivase aktiviert, die die Radikalbildung in der Peptidkette der α -Untereinheit initiiert. Diese Initialisierung sollte

durch Aktivierungsstudien der heterolog exprimierten Methylalkylsuccinat-Synthase (MasCDE) mit der ebenfalls heterolog exprimierten potentiellen Aktivase (MasG) gezeigt werden.

1.2.1. Aktivase

Bei der Aktivase zeigte sich drei Stunden nach der Induktion mit IPTG eine starke Expression einer rund 40 kDa großen Proteinbande (siehe Abb. 13). Dies entspricht der errechneten Größe des Fusionsproteins aus Aktivase mit SRB-Tag. Des weiteren konnte das Fusionskonstrukt in Western-Blot Analysen über das Signal gegen den SBP-Tag identifiziert werden. Jedoch zeigte sich nach der Affinitätsreinigung eine aufkonzentrierte, unbekannte Proteinbande (ca. 60 kDa) auf dem SDS-PAGE Gel, welche in der Negativkontrolle (induzierte *E.coli* BL21DE3*-Zellen ohne Insert) nicht auftrat (Daten nicht gezeigt). Die Vermutung, dass es sich hierbei um ein biotinyliertes *E.coli* Protein handelt, welches in Konkurrenz zu dem Fusionsprotein an die Bindetaschen der Strep-Tactin-Matrix bindet, konnte somit nicht bestätigt werden. Auch war die Proteinkonzentration der Aktivase nach der Säule im Vergleich zum induzierten Rohextrakt sehr gering (visuelle Abschätzung im SDS-PAGE Gel). Das unbekannte Protein von ca. 60 kDa zeigte auch im Western-Blot kein Signal mit dem Strep-Tactin HRP Konjugat-Antikörper, so dass die Bildung eines falsch translatierten Proteins (falscher Transkriptionsstartpunkt) ausgeschlossen werden kann. Auch der Zusatz von 50 mM Dithiothreitol (DTT) oder 2% (v/v) Triton X-100 zu Aufschluss- und Reinigungspuffern führten nicht zur Reduzierung der Kontamination. Dabei diente DTT zur Stabilisierung von SH-Gruppen in den Proteinen, um eine unspezifische Bindung des unbekannt Proteins darüber zu unterbinden. Triton X-100 hingegen sollte nicht-kovalente Bindungen von Proteinen verhindern. Aufgrund der Integrität des Säulenmaterials konnten keine höheren Konzentrationen von DTT und Triton X-100 eingesetzt werden. Eine selektive Abtrennung des verunreinigenden Proteins über einen 50 MWCO Membranfilter war ebenfalls erfolglos. Bis jetzt konnte noch keine abschließende Lösung für die Abtrennung der Kontamination gefunden werden.

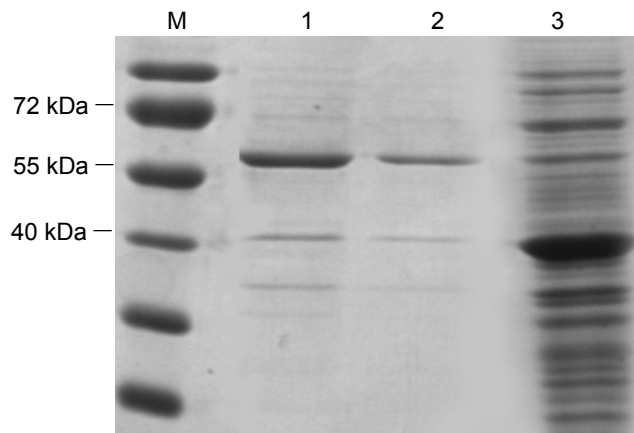


Abbildung 13: Reinigungsfractionen der heterolog exprimierten Aktivase
Die Auftrennung erfolgte auf einem 12% SDS-PAGE Gel. Die zu erwartende Größe des Fusionsproteins liegt bei ca. 40 kDa.
M, Proteinstandard; 1+2, Elutionsfraktionen; 3, *E. coli* Zellextrakt nach Induktion

1.2.2. Methylalkylsuccinat-Synthase (MasCDE)

Im Genom von Stamm HxN1 konnten, analog zu Benzylsuccinat-Synthasen, drei potentielle Untereinheiten (α -, *masD*; β -, *masE* und γ -Untereinheit, *masC*) für die Methylalkylsuccinat-Synthase detektiert werden (Grundmann *et al.*, 2008). Für das Überexpressions-Konstrukt dieser drei Untereinheiten wurde nur die α -Untereinheit N-terminal mit dem GST-Tag fusioniert. Eine C-terminal Fusion wurde ausgeschlossen, da sich nach der Aktivierung das Glycinradikal am C-Terminus des Proteins bildet und somit negative Auswirkungen auf das aktive Zentrum vermutet wurden. Die β - und γ -Untereinheit wurden, wie auf der genomischen DNA von HxN1, ober- bzw. unterhalb zu der α -Untereinheit in den Vektor kloniert (siehe Abb. 8). Da die genauen Bindungsverhältnisse der drei Untereinheiten im nativen Enzym nicht bekannt sind, wurde auf eine Fusion der β - und γ -Untereinheit verzichtet. Aufgrund ihrer geringen Molekularmasse (8 kDa und 7 kDa) könnte Fusion mit einem Tag die korrekte Faltung und somit die Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase beeinträchtigen.

Drei Stunden nach Induktion der Kultur zeigte sich deutlich eine Überproduktion des Fusionsprodukts (α -Untereinheit mit GST-Tag; ca. 120 kDa) in *E. coli* (Abb. 14, A). Die Identifizierung der β - und γ -Untereinheit zusammen mit der α -Untereinheit ist aufgrund der stark unterschiedlichen relativen Molekülmassen (β - und γ -Untereinheit < 10 kDa, α -Untereinheit mit GST-Tag >100 kDa) in einem SDS-PAGE-System nur

schwer möglich (Schägger, 2006). Daher erfolgte die Separation der kleinen Untereinheiten mit 16,5% Tricin- bzw. 17% Acrylamid-Gelen, die Identifizierung über Immunodetektion. Unter Verwendung der generierten Antikörper gegen die β - und γ -Untereinheit konnte sowohl die Expression beider Proteine im MasCDE-Konstrukt in *E.coli*, als auch ihr Vorhandensein in den Elutionsfraktionen der Methylalkylsuccinat-Synthase nachgewiesen werden (Abb. 14, C). Um dabei Kreuzreaktionen des Antikörpers gegen Wirtsproteine auszuschließen, wurden Elutionsfraktionen von *E.coli* BL21DE3*-Zellen ohne Insert als Negativkontrollen verwendet. Die Identifikation aller Untereinheiten der Methylalkylsuccinat-Synthase in einer Elutionsfraktion unterstellt, dass die Peptide richtig gefaltet werden und sich daraus in *E.coli* das native Protein zusammensetzt.

Wie auch bei der alleinigen Überexpression der α -Untereinheit befand sich nur ein geringer Teil des Methylalkylsuccinat-Synthase-Gesamtproteins in der löslichen Fraktion, die auf die Säule aufgetragen wurde (siehe Abb. 14, A und B). Trotzdem konnten aus einem 50 ml Kulturansatz 24 μ g Protein mit hoher Reinheit gewonnen werden. Aufgrund der bisher nicht vollständig gereinigten Aktivase wurden bisher jedoch keine *in vitro* Aktivierungsexperimente durchgeführt.

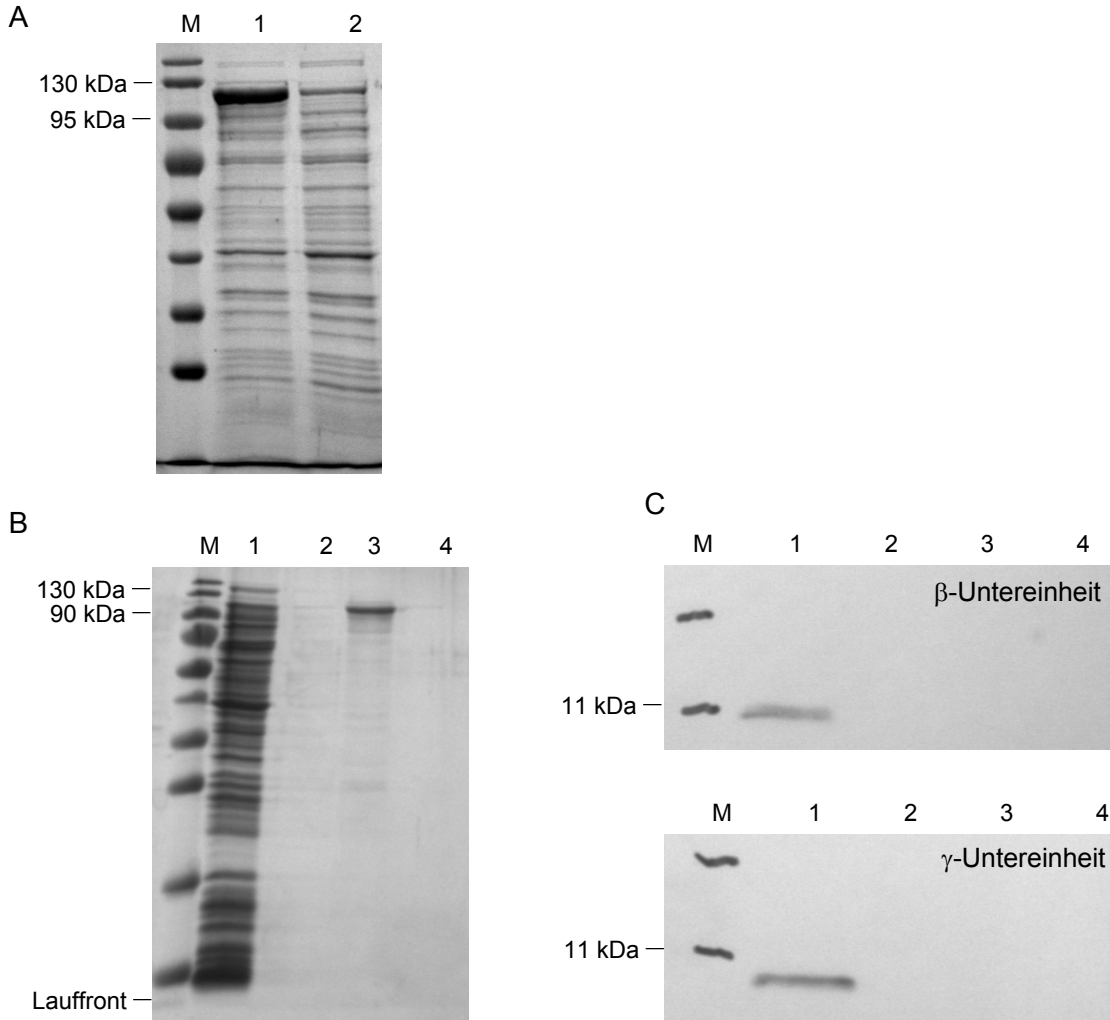


Abbildung 14: Heterologe Expression und Reinigung des Methylalkylsuccinat-Synthase (Mas)-Gesamtkonstruktes

A, Heterologe Expression des Gesamtkonstruktes. Die Trennung der Proteine erfolgte auf einem 12% SDS-PAGE Gel, zur Färbung wurde Coomassie R250 verwendet. M, Proteinstandard; 1, *E. coli* Zellextrakt nach der Induktion mit IPTG (3h); 2, *E. coli* Zellextrakt vor der Induktion

B, Reinigungsfraktionen der heterolog expremierten Mas. Die Proteine wurden auf einem 17% SDS-PAGE Gel getrennt, die Färbung erfolgte mit Coomassie R250. M, Proteinstandard; 1, aufgeschlossener Extrakt *E. coli* mit Mas; 2-4, Elutionsfraktionen (2-4 ml) der Mas

C, Immunoblot der gereinigten Methylalkylsuccinat-Synthase mit spezifischen Antiseren gegen die β - und γ -Untereinheit. Proteine wurden auf einem 17% SDS-PAGE Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblotet. Die Detektion erfolgte über Meerrettich Peroxidase markierte Zweit-Antikörper, die Detektionszeit betrug 2 min. M, Proteinstandard; 1, Elutionsfraktion E3 der gereinigten Methylalkylsuccinat-Synthase (ca. 4 μ g); 2-4, Elutionsfraktionen (2-4ml) der Negativkontrolle (*E. coli* BL21DE3* ohne Insert)

2. Identifikation von *mas*-Genen in *n*-Alkan verwertenden Anaerobiern

Erste Hinweise auf den Aktivierungsmechanismus für *n*-Alkane unter anoxischen Bedingungen gaben Metabolitstudien unter denitrifizierenden (Wilkes *et al.*, 2003) und sulfatreduzierenden (Cravo-Laureau *et al.*, 2005) Bedingungen, in denen das Additionsprodukt verschiedener Alkane an Fumarat nachgewiesen werden konnte. HxN1 stellte den ersten Organismus dar, für den die Gene zur Aktivierung von *n*-Hexan unter anaeroben Bedingungen identifiziert wurden (Grundmann *et al.*, 2008). Um einen Überblick über die Diversität der Gene des anaeroben Alkanabbaus zu erhalten, sollten diese in weiteren Stämmen identifiziert und sequenziert werden.

2.1. Stamm OcN1

Zur Identifizierung der *mas*-Gene in Stamm OcN1 wurde eine Fosmid Bibliothek mit 20 µg genomischer DNA erstellt. Die Bank umfasste ca. 5000 Klone. Dies entspricht, bei einer angenommenen Genomgröße von 6 Mb und einer Fosmid-Durchschnittsgröße von 40 kb, einer über 99,99% Wahrscheinlichkeit, dass das Gesamtgenom von OcN1 repräsentiert ist (Carbon-Clark Formel: $N = \lceil \ln(1-p) / \ln(1-f) \rceil$; N = Anzahl der Klone; p = Wahrscheinlichkeit; f = Klonegröße/Genomgröße). Für das Screening der Fosmid-Bank mittels Koloniehybridisierung wurden aus der gemischten Bibliothek ca. 14500 Klone ausplattiert und mit der OcN1 spezifischen, [α -³³P]-dATP markierten Sonde hybridisiert. Es konnten 56 positive Klone identifiziert werden, von denen ein Klon zur Sequenzierung der Fosmid-DNA ausgewählt wurde. Die von GATC Biotech (Konstanz) gelieferten Sequenzdaten umfassten die 2-fache Abdeckung der aus dem Fosmid erstellten 96 Shotgun-Klone. Eine Sequenzierung bis zur 4-fachen Abdeckung ausgewählter Bereiche und der Lückenschluss zwischen den Shotgun Klonen erfolgten in dieser Arbeit. Dabei stellte sich heraus, dass nicht die Gesamtfosmidsequenz in den Shotgun-Klonen abgedeckt war. Die Lücke wurde über PCR an Fosmid-DNA, als auch an der genomischen DNA von OcN1 geschlossen. Wie eine anschließende Sequenzierung des PCR-Produktes an der genomischen DNA ergab, befindet sich in der α -Untereinheit des Fosmids ein Rasterschub, bei dem die Base Cytosin fehlt. Ohne diese Base kann aus der Sequenz kein potentiell funktionales Protein abgeleitet werden, so dass es sich hierbei um eine Mutation auf dem Fosmid handeln muss.

Abbildung 15 zeigt die BLASTP-Ergebnisse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) von 11 translatierten offenen Leserahmen (ORFs) aus der OcN1-Sequenz. Auffallend hierbei ist die starke Ähnlichkeit in der Genomorganisation zu bereits bekannten Operons des anaeroben Alkan-Abbaus (Grundmann *et al.*, 2008, Callaghan *et al.*, 2008) und Toluol-Abbaus (Coschigano *et al.*, 1998; Leuthner *et al.*, 1998; Achong *et al.*, 2001; Kube *et al.*, 2004). Alle ORFs zeigten als erste Treffer beim Blast Proteine der anaerob Alkan verwertenden Organismen HxN1 und AK-01 (ORF 1-7) bzw. des anaerob Toluol verwertenden Stamms EbN1 (ORF 8-11) an. Die ORFs 4-6 codieren Proteine ähnlich zu der α -, β - und γ -Untereinheit der Methylalkylsuccinat-Synthase (Mas) in HxN1. Die Identität der beiden kleinen Untereinheiten zu HxN1 beträgt dabei 82% (β -Untereinheit) bzw. 70% (γ -Untereinheit). Die potentielle α -Untereinheit in OcN1 (ORF 5) zeigt auf Proteinebene eine 86%ige Identität zu HxN1. Ein detaillierterer Vergleich der α -Untereinheiten erfolgt im Ergebnisteil unter Kapitel 3.

Das Genom von AK-01 wird zurzeit sequenziert (<http://genome.ornl.gov/microbial/dalk>; 26. April 2007, Draft Version) und dabei wurden bisher nur die α -Untereinheiten annotiert. Unter Einbeziehung der Sequenzdaten von HxN1 konnten aber zwei mögliche Proteine für die β -Untereinheit, DalkDraft_3741 (Ass1) und DalkDraft_4989 (Ass2), in AK-01 identifiziert werden. Die Identität zur β -Untereinheit von OcN1 beträgt 63% bzw. 61%. Potentielle γ -Untereinheiten konnten in den verfügbaren Genomdaten nicht gefunden werden, jedoch ist deren Vorhandensein in Callaghan *et al.*, 2008 veröffentlicht. Die benötigte Aktivase zur Initialisierung der Methylalkylsuccinat-Synthase ist wahrscheinlich von ORF 7 (E-Wert: $2e-154$) kodiert. Auf Proteinebene hat sie eine Identität 77,8% zur Aktivase von Stamm HxN1.

Als weiteres Protein konnte in der OcN1-Sequenz im 5'-Bereich der *mas*-Gene eine Acyl-CoA-Dehydrogenase (ORF 2) ähnlich zu HxN1 gefunden werden. Die Ähnlichkeit beträgt dabei auf Proteinebene 82,6%.

Ein nicht annotierter ORF in Stamm HxN1, ebenfalls wie ORF1 aus Stamm OcN1 direkt vor der Acyl-CoA-Dehydrogenase lokalisiert, zeigt eine Identität von 59% zu diesem. Eine weitere Datenbanksuche des Proteins ergibt als ersten Treffer ein unbekanntes Protein aus Stamm AK-01 (DalkDraft_5000). DalkDraft_5000 befindet sich jedoch nicht in direkter Nachbarschaft zu den Genen der *ass2*, sondern ist in deutlicher Entfernung (~13650bp) zu *AssA2* zu finden. Auch in den Toluol abbauenden Organismen EbN1 und *Thauera aromatica* konnte ein orthologes Protein zu ORF 1 in direkter Nachbarschaft zum *bss*-Operon gefunden werden, nicht jedoch im Operon von

Geobacter metallireducens. Im Gegensatz zu den Stämmen OcN1, HxN1 und AK-01 befindet sich das Gen sowohl bei EbN1 (*bssG*) als auch bei *T. aromatica* (*bssG*) unterhalb zu den *bss*-Untereinheiten.

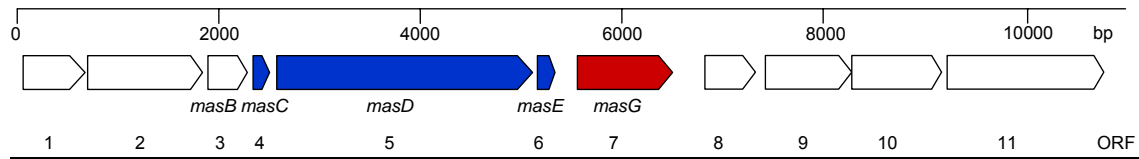
ORF 3 von Stamm OcN1 weist eine hohe Ähnlichkeit zu dem hypothetischen Protein MasB aus Stamm HxN1 (E-Wert: $2e-44$) auf. Das *masB*-Gen befindet sich in einem Operon mit den drei Untereinheiten der Methylalkylsuccinat-Synthase, 266 bp vor der α -Untereinheit. Auch in Stamm AK-01 konnten zwei ähnliche Proteine identifiziert werden, die 340 bp bzw. 377 bp vor der α -Untereinheit der Ass kodiert sind (DalkDraft_3743, E-Wert: $6e-24$; DalkDraft_4987, E-Wert: $1e-21$). Ein homologes Protein konnte bisher in keinem Toluol-abbauenden Organismus gefunden werden.

In etwas größerer Entfernung, ca. 300bp abwärts der *mas*-Gene, sind potentielle Proteine kodiert, wie sie auch in Stamm EbN1 in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Genen der Benzylsuccinat-Synthase (*Bss*) vorkommen. ORF 8, ORF 9 und ORF 11 kodieren für hypothetische Proteine, deren Funktion bisher unbekannt ist. Das Protein von ORF 10 wurde als eine potentielle Zucker-Dehydratase identifiziert. Transposasen, wie sie im Operon von HxN1 gefunden wurden, konnten in OcN1 nicht identifiziert werden.

Die Genorganisation in OcN1 lässt vermuten, dass für das Operon ähnlich wie in HxN1 ein polycystronisches Transkript vorliegt. Erste RT-PCR Versuche mit RNA, die aus mit Oktan gewachsenen Zellen isoliert wurde, zeigten, dass das Transkript mindestens ORF 2-7 umfasst (Webner, 2008). Die co-Transkription von ORF 8-11 konnte aber noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Auch die für die nächstverwandten BLASTP-Treffer aus EbN1 (C2B001, C2A200, C2A203 und C2A204) konnte nicht abschließend geklärt werden, ob diese Gene Teil des *bss*-Operons sind (Kube *et al.*, 2004).

Ergebnisse

A)



BLASTP Ergebnisse

ORF	Länge (Aminosäuren)	Protein/Accession-Nummer	Organismus ^a	E-Wert	Potentielle Funktion
1	202	DalkDraft_5000/ZP_02129917	AK-01	8e-29	Hypothetisches Protein
2	379	MasA/CAO03071	HxN1	0	Acyl-CoA-Dehydrogenase
3	128	MasB/CAO03072	HxN1	2e-44	Hypothetisches Protein
4	61	MasC/CAO03073	HxN1	6e-20	Mas, γ -Untereinheit
5	851	MasD/CAO03074	HxN1	0	Mas, α -Untereinheit
6	71	MasE/CAO03075	HxN1	7e-27	Mas, β -Untereinheit
7	325	MasG/CAO03077	HxN1	2e-154	Mas, Aktivase
8	177	C2B001/CAI07165	EbN1	4e-9	Hypothetisches Protein
9	282	C2A200/CAI07166	EbN1	3e-78	Hypothetisches Protein
10	308	C2A203/CAI07167	EbN1	6e-86	Zucker-Dehydratase
11	516	C2A204/CAI07168	EbN1	5e-90	Konserviertes hypothetisches Protein, Amidohydrolase Familie

^a: AK-O1: *Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01; HxN1: *Azoarcus* sp. HxN1; EbN1: *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1

B)

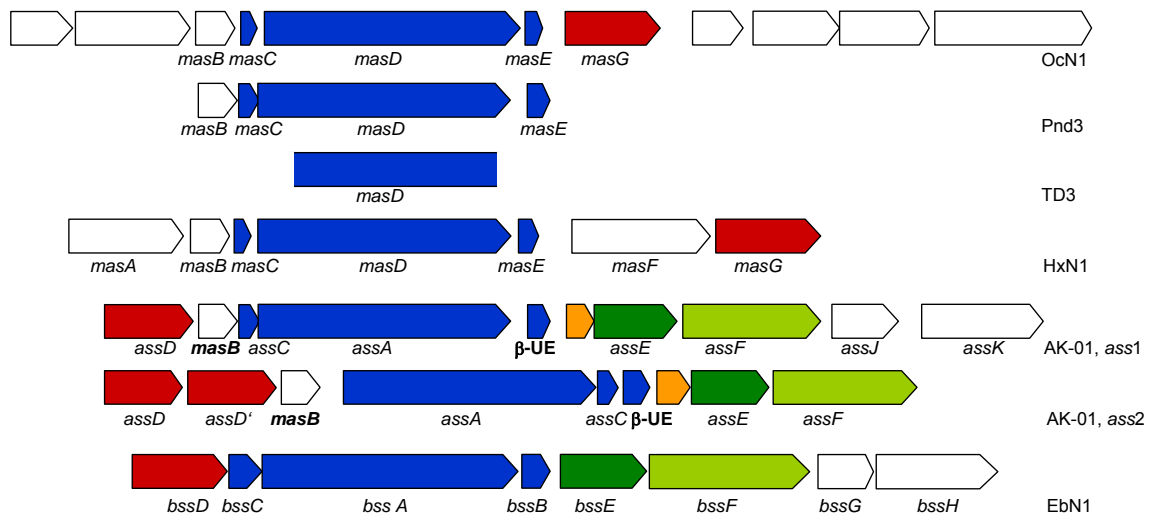


Abbildung 15: Das Methylalkylsuccinat-Synthase (Mas) Operon

A, Genetische Organisation des Methylalkylsuccinat-Synthase (Mas) Operons in Stamm OcN1. Die Benennung der *mas*-Gene (blau) erfolgte analog zu Stamm HxN1, die potentielle Aktivase (*masG*) ist rot dargestellt. Die potentiellen Funktionen der anderen Proteine sind in der Tabelle aufgeführt. (Erklärung zu B siehe Folgeseite)

Fortsetzung Abbildung 15: B, Vergleich der Genstruktur potentieller Alkan-Aktivierungs-Operons in den Stämmen OcN1, *Desulfatibacillum* sp. Pnd3, *Desulfothermus naphthae* (TD3) und Stamm HxN1 (Grundmann *et al.*, 2008), sowie Stamm AK-01 (*ass1* und *ass2*; Callaghan *et al.*, 2008). Zum Vergleich mit einem Toluol-abbauenden Stamm wurde das *bss*-Operons aus EbN1 (Kube *et al.*, 2004) hinzugefügt. Der Farbcode ist analog zu Teil A. Gene mit potentiell ähnlicher Funktion sind einheitlich farbig (hell- und dunkelgrün, orange) dargestellt. Ihre genaue Funktion ist noch nicht geklärt. Die Daten für OcN1, Pnd3 und TD3 wurden in dieser Arbeit generiert, die Zuordnung und Benennung der Gene in anderen Stämmen erfolgte nach den Originalpublikationen. Fett dargestellt sind Neuuzuordnungen von potentiellen Proteinen in AK-01, die bisher nicht annotiert wurden. *AssC*-Gene wurden nach Callaghan *et al.*, 2008 zugeordnet, in den bisher zugänglichen Genomdaten konnten sie nicht identifiziert werden.

2.2. *Desulfothermus naphthae* (TD3) und *Desulfatibacillum* sp. (Pnd3)

Zur Identifizierung weiterer möglicher *mas*-Gene wurde von Stamm TD3 ebenfalls eine Fosmid-Library erstellt. Die Bank umfasste ca. 300 Klone. Dies entspricht nach der Carbon-Clark Formel (siehe OcN1) einer ca. 90%igen Wahrscheinlichkeit, dass das Gesamtgenom von TD3 enthalten ist. Die geringe Anzahl an Klonen ist auf die niedrige Ausgangsmenge der verwendeten DNA zurückzuführen (ca. $\frac{1}{5}$ der normalerweise eingesetzten Menge). Die Isolierung neuer genomischer DNA zur Herstellung einer weiteren Library war aufgrund des langsamen Wachstums von TD3 nicht mehr möglich. Als Sondenprimer wurden die Primer Nr. 150/151 eingesetzt, die ein ca. 550 bp Fragment aus der großen Untereinheit amplifizieren. Ein erstes PCR-Screening an isolierter Fosmid-DNA aus der gepoolten Bibliothek mit den Sondenprimern führte zu keinem positiven Ergebnis. Auch durch Koloniehybridisierung konnte kein positiver Klon identifiziert werden. Daher erfolgte das weitere Screening nach potentiellen *mas*-Genen über PCR mit degenerierten Primern. Hiermit konnte ein 2379 bp Produkt der potentiellen α -Untereinheit gewonnen werden. Das Protein zeigt ca. 76% Identität mit *AssA1* von AK-01. Versuche mit weiteren degenerierten Primerpaaren (Lokalisation: forward-Primer: γ -Untereinheit; reverse-Primer: β -Untereinheit), die eine Amplifikation der gesamten α -Untereinheit ermöglichen sollten, führten zu keinem PCR Produkt.

Die gleiche Methode wurde für Pnd3 angewendet. Unter der Annahme eines ähnlichen Operon Aufbaus wurden die Primerpaare aus den Sequenzdaten des Stammes AK-01 abgeleitet, da AK-01 ebenso wie TD3 und Pnd3 *n*-Alkane unter sulfatreduzierenden Bedingungen abbaut. Die PCR wurde dabei in allen Fällen mit Taq-Polymerase an genomischer DNA durchgeführt und die erhaltenen Produkte dann kloniert und sequenziert. Bei Pnd3 konnten so drei verschiedene PCR Produkte amplifiziert werden. Durch Überlappung der Sequenzenden konnte daraus eine

Gesamtsequenz von 4034 bp generiert werden aus der mittels BLASTP alle drei potentiellen *mas*-Untereinheiten, sowie ein MasB ähnliches Protein identifiziert wurden. Die Identität aller Proteine im Vergleich mit den entsprechenden Proteinen aus Stamm AK-01, Ass1 beträgt 99%-100%. Eine Ausnahme bildet die γ -Untereinheit von Stamm AK-01, die nicht in den Datenbanken annotiert ist. Die Identität zur γ -Untereinheit in Stamm HxN1 beträgt hierbei 47%. Auch Teile eines Gens 217 bp downstream zur β -Untereinheit wurden amplifiziert. Ein ähnliches Gen konnte bisher nur in den beiden *ass*-Operons von AK-01 gefunden werden, nicht jedoch in den Genomen anderer anaerob Alkan oder Aromaten verwertender Organismen. Die hohe Identität der Proteine von Pnd3 zu Ass1 konnte auch auf Nukleotid-Ebene (bei allen Genen über 99,4% Identität) bestätigt werden. Da auch die 16S rRNA-Identität beider Organismen bei über 99% liegt, handelt es sich vermutlich um eine Art, was aber noch durch z. B. DNA-DNA Hybridisierungen bestätigt werden müsste (Rosselló-Mora und Amann, 2001).

3. Vergleich der α -Untereinheiten von OcN1, Pnd3 und TD3 mit bekannten großen Untereinheiten von Glycyl-Radikal Enzymen (GRE)

Die drei neu generierten Sequenzen zeigen größere Ähnlichkeiten zu den bereits bekannten Sequenzen der Alkanabbauer. Die Identität zu MasD und AssA1 liegt bei über 70%, wohingegen die Identität mit bekannten Benzylsuccinat-Synthasen Sequenzen durchschnittlich bei 40% liegt. Abbildung 16 zeigt die relative Verwandtschaft der Sequenzen auf Aminosäureebene. Die neu generierten Sequenzen bilden ein Cluster mit MasD und AssA1, welches sich deutlich von den Benzylsuccinat-Synthasen (Bss) und Naphtylmethylsuccinat-Synthasen (Nms)-Clustern abhebt. Innerhalb des Alkan-Clusters erfolgt nochmals eine Aufspaltung. Dabei bilden die Sequenzen von AK-01, Pnd3 und TD3 einen Zweig, der andere wird durch HxN1 und OcN1 gebildet. Inwieweit diese Aufspaltung substratspezifisch ist (HxN1 und OcN1 verwenden C₆-C₁₂ Alkane, AK-01, Pnd3 und TD3 nutzen eher langkettige Alkane von C₆-C₁₇) oder der unterschiedliche Elektronenakzeptor (HxN1 und OcN1: Nitrat; AK-01, Pnd3 und TD3 Sulfat) verantwortlich ist, kann bis jetzt nur spekuliert werden. Die Sequenzen der erst kürzlich entdeckten α -Untereinheiten der Naphtylmethylsuccinat-Synthasen besitzen eine Identität von 38,5% bis 43,4% zu den Alkanabbauersequenzen. Bei anderen GRE, die nicht die Addition von Fumarat an das Substrat katalysieren (Pyruvat-Formiat Lyase, anaerobe Ribonukleotid Reduktase und *p*-Hydroxyphenylacetat Decarboxylase) sinkt die Sequenzidentität zu den Alkanabbauern auf unter 30%. Eine Ausnahme bilden hierbei die Sequenzen der Glycerol Dehydrogenasen, die eine deutlich höhere Identität von 33,6% bis 39,7% auf Proteinebene aufweisen.

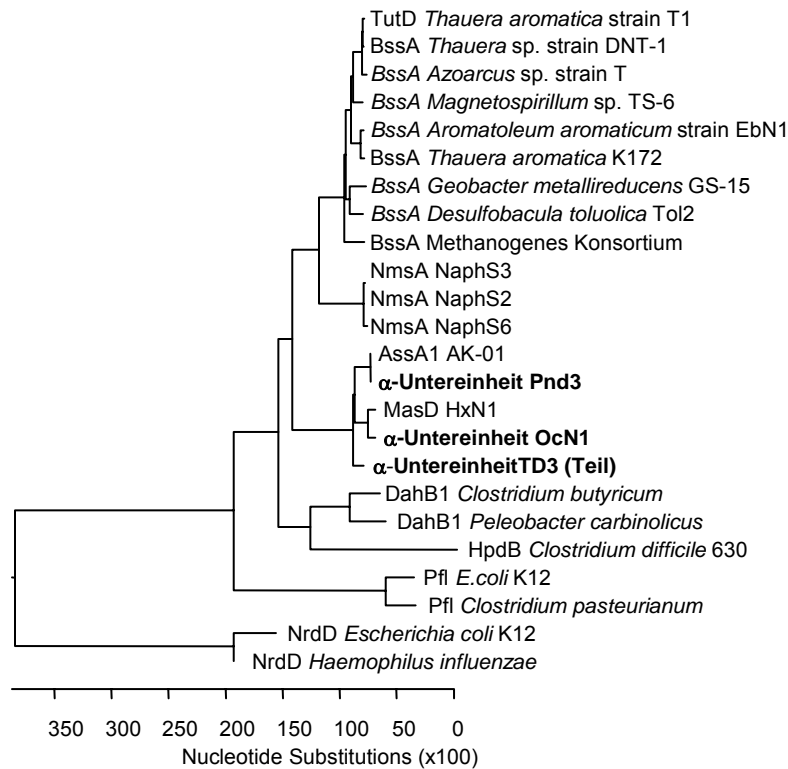


Abbildung 16: Stammbaum abgeleitet vom Alignment der potenziellen α -Untereinheiten von Glycin-Radikal Enzymen

Das Alignment wurde mittels ClustalW in dem DNASTAR Programm (Lasergene) berechnet. Tut, Benzylsuccinat-Synthase; Bss, Benzylsuccinat-Synthase; Nms, Naphthylmethylsuccinat-Synthase; Ass, Alkylsuccinat-Synthase; Mas, 1-Methylalkylsuccinat-Synthase; Dah, Glycerol Dehydrogenase; Hpd, *p*-Hydroxyphenylacetat Decarboxylase; Pfl, Pyruvat Formiat Lyase; Nrd, Anaerobe Ribonukleotid Reductase (Klasse III).

Accession-Nummer (von oben nach unten, ohne Pnd3, TD3 und OcN1): AAC38454; BAC05501; AAK50372; BAD42366; YP_158060; CAA05052; YP_384498; CAO72221; EF134965; CAO72220; CAO72219; CAO72222; ABH11460; CAO03074; AAM54728; YP_356813; CAJ66973; NP_415423; NP_415423; CAA63748; AAC77195; P43752

Für Stamm AK-01 wurde nur die AssA1-Sequenz mit aufgenommen, da bisher nur die Aktivität dieses Proteins nachgewiesen wurde. Die Funktionalität der zweiten α -Untereinheit in Stamm AK-01 (AssA2) ist bisher nur spekulativ (Callaghan *et al.*, 2008). Bei Stamm TD3 wurde eine Teilsequenz von 2379 bp verwendet. Unter Berücksichtigung der durchschnittlichen Länge der anderen α -Untereinheiten von Alkanabbauern entspricht dies ca. 95% der gesamten α -Untereinheit.

Alle drei potentiellen α -Untereinheiten von OcN1 (ORF 5), TD3 und Pnd3 weisen in der translatierten Proteinsequenz ein Glycin im N-terminalen Bereich (OcN1: Pos. 826, Pnd3: Pos. 810 und TD3: Pos. 789; siehe Abb. 17) auf, wie es charakteristisch für alle Mitglieder der GRE-Proteinfamilie ist. Das konservierte Glycin ist wahrscheinlich Bestandteil des aktiven Zentrums und bildet das katalytisch aktive Radikal. Der Bereich um das Glycin ist hoch konserviert und unterscheidet sich nur in wenigen Aminosäuren. Alle Enzyme, die eine Addition an Fumarat katalysieren, weisen ein (IVRXXGXS)-Motiv auf (Abb. 17, grauer Kasten). Innerhalb dieses Motivs können die einzelnen Substratgruppen (Alkane, Toluol, Methylnaphthalin) unterschieden werden. So befindet sich in allen Toluol-verwertenden Organismen direkt vor dem Glycin die Aminosäure Serin statt Alanin. Dagegen ist in allen bekannten Sequenzen von Methylnaphthalin-Abbauern an der zweiten Position vor dem Glycin Valin gegen Isoleucin ausgetauscht. Ein weiteres Merkmal aller GRE ist das Vorkommen eines konservierten Cysteins, welches ebenfalls im aktiven Zentrum des Proteins lokalisiert ist und ein transientes Thiyl-Radikal bildet. Alle neu generierten Sequenzen weisen auch dieses Cystein-Motiv (OcN1: Pos. 490; Pnd3: Pos 473 und TD3: Pos. 452) auf (Alignment nicht gezeigt).

814	P E G Y Q E V I V R - V A G Y S A H	ORF 5 OcN1
798	P E K Y S E V I V R - V A G Y S A H	α -Untereinheit Pnd3
777	P E K Y Q E V I V R - V A G Y S A H	α -Untereinheit TD3 (Teil)
802	P E G Y Q E V I V R - V A G Y S A H	MasD HxN1
798	P E K Y S E V I V R - V A G Y S A H	AssA1 AK-01
791	P E K W Q S M I V R - I A G Y S A R	α -Untereinheit Nms NaphS6
791	P E K W E S L I V R - I A G Y S A R	α -Untereinheit Nms NaphS3
791	P E K W E S L I V R - I A G Y S A R	α -Untereinheit Nms NaphS2
813	P E K H Q D L I V R - V S G F S A R	BssA <i>Aromatoleum aromaticum</i> strain EbN1
816	P E K H H D L I V R - V S G Y S A R	TutD <i>Thauera aromatica</i> strain T1
816	P E K H S D L I V R - V S G Y S A R	BssA <i>Azoarcus</i> sp. strain T
816	P E K H H D L I V R - V S G Y S A R	BssA <i>Thauera</i> sp. strain DNT-1
813	P E K H Q D L I V R - V S G F S A R	BssA <i>Thauera aromatica</i> K172
812	P E K H H D L I V R - V S G Y S A R	BssA <i>Magnetospirillum</i> sp. TS-6
814	P E K H Q D L I V R - V S G F S S R	BssA <i>Desulfobacula toluolica</i> Tol2
814	P E K H Q D L I V R - V S G F S A R	BssA <i>Geobacter metallireducens</i>
699	P E K H Q D L I V R - V S G F S A R	BssA Methanogenic consortium
723	P E K Y P Q L T I R - V S G Y A V R	Pfl <i>Escherichia coli</i> K12
733	P D K Y P Q L T I R - V S G Y A V R	Pfl <i>Haemophilus influenzae</i>
668	H D A S R V S V T R R V C G Y L G S	NrdD <i>Escherichia coli</i> K12
669	H D S T K V S V T R R V C G Y L G S	NrdD <i>Haemophilus influenzae</i>
657	- - - - - I C P T H G Y L A G	NrdD <i>Ralstonia eutropha</i> H16
763	P E D F K G L V V R - V A G Y S A F	Dah <i>Peleobacter carbinolicus</i>

Abbildung 17: Partielles Alignment der N-terminalen Domäne potenzieller α -Untereinheiten von Glycinradikal Enzymen

Das Alignment wurde mittels ClustalW mit DNASTAR (Lasergene) berechnet. Enzymnamen und Accession-Nummern sind identisch zu Abb. 16. Aminosäuren, die mit ORF 5 von OcN1 übereinstimmen, sind fett dargestellt; grau: konservierter Sequenzbereich von Glycyl-Radikal-Enzymen, die eine Fumarat-Addition katalysieren; schwarz: hochkonserviertes Glycin

4. Vergleich der Aktivase von Ocn1 mit anderen SAM Enzymen

Die potentielle Aktivase von Ocn1 befindet sich 173 bp unterhalb zur β -Untereinheit. Somit ist sie in Ocn1 ebenso wie in HxN1 stromabwärts der *mas*-Gene kodiert. Im Gegensatz dazu ist die Aktivase in allen bekannten Toluol-Abbauern und in AK-01 oberhalb der *mas*-Gene lokalisiert. Auch in Pnd3 muss die Aktivase oberhalb zu den *mas*-Genen kodiert sein, da ein PCR-Produkt mit einem fw-Primer am Ende der Aktivase (Primer-Nr. 249) und einem rev-Primer in der α -Untereinheit (Primer-Nr. 244) erzielt werden konnte. Allerdings war die erhaltene Sequenz zu kurz, um sie in den relativen Stammbaum (Abb. 18) einzubinden. Dieser zeigt, dass die Aktivase von Ocn1 gemeinsam mit den anderen Aktivasen von Alkanabbauern ein distinktes Cluster bildet. Die Sequenzidentität zu Stamm HxN1 beträgt 77%, zu Stamm AK-01 dagegen nur 53,9%. Wie auch schon in dem Stammbaum der α -Untereinheiten zeigten die nächstverwandten Aktivasen verschiedener Benzylsuccinat-Synthasen Identitäten von 38%-40%. Die Aktivasen anderer GRE lagen um 30%, wobei die Identität der Aktivase der Glycerol Dehydrogenase (DahB2) von *Clostridium novyi* mit 36% hervorzuheben ist. Lysine 2,3 Aminomutase (Lam), Biotin Synthase (Bio) und Lipoyl Synthase (Lip) dagegen gehören zu einer anderen Unterklasse der SAM-Familie (sind nicht Mitglied der GRE-Klasse) und zeigen nur eine sehr geringe Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz (um 10%).

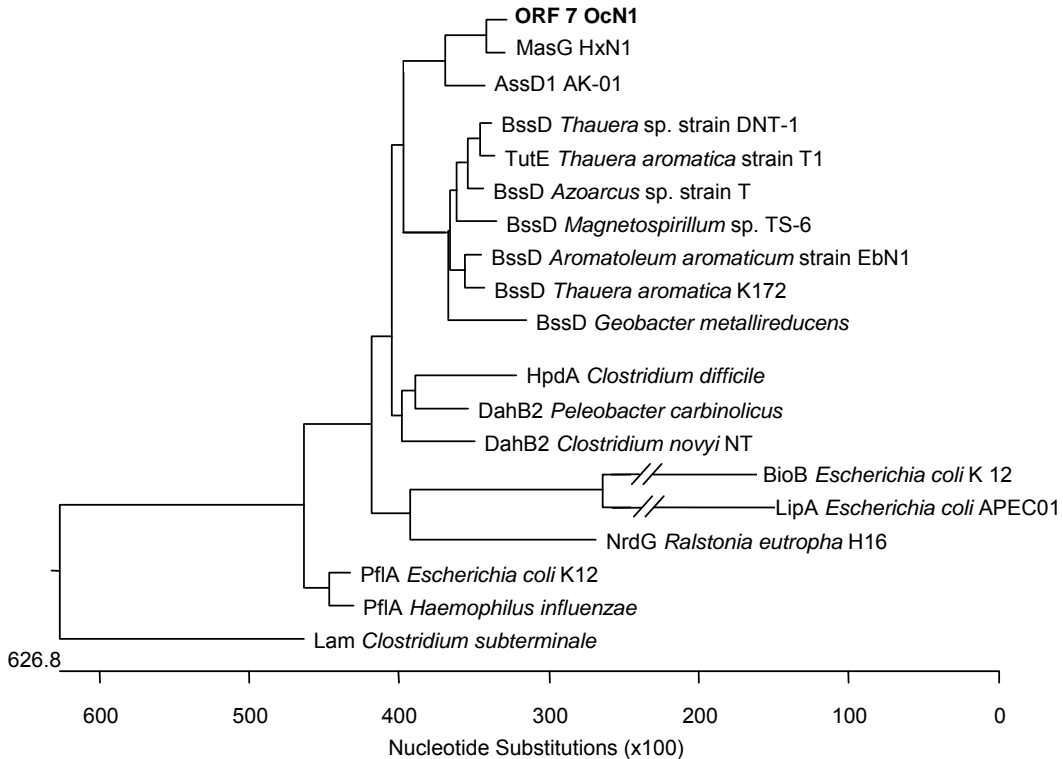


Abbildung 18: Relativer Stammbaum abgeleitet vom Alignment der potentiellen Aktivase von OcN1 und anderen Proteinen der „Radical SAM Superfamily“

Die Äste von BioB und LipA sind verkürzt dargestellt und entsprechen nicht den tatsächlichen Verhältnissen. Mas, 1-Methylalkylsuccinat-Synthase; Ass, Alkylsuccinat-Synthase; Bss, Benzylsuccinat-Synthase; Tut, analog zu Bss; Pfl, Pyruvat Formiat Lyase; Dah, Glycerol Dehydrogenase; Hpd, *p*-Hydroxyphenylacetat Decarboxylase; Nrd, Anaerobe Ribonukleotid Reductase (Klasse III); Lam, Lysine 2,3 Aminomutase; Bio, Biotin Synthase; Lip, Lipoyl Synthase. Accession-Nummern (von oben nach unten, ab MasG): CAO03077; ZP_02130616; BAC05499; AAC38452; AAK50370; BAD42364; CAI07157; CAA05050; YP_384500; YP_001086624; YP_356812; YP_877304; NP_415296; YP_851757; AAP85990; NP_415422; AAC21848; AAD43134

Alle Aktivasen von Glycyl-Radikal Enzymen werden der Proteinfamilie S-Adenosylmethionin-abhängiger Enzyme (SAM) zugeordnet. Ein typisches Motiv dieser Familie ist das CXXXCXXCXX-Motiv, welches ein spezielles [Fe₄S₄]-Cluster koordiniert. Abb. 19 zeigt ein partielles Alignment bekannter SAM-Enzyme im Bereich dieses Motives, welches auch in Stamm OcN1 identifiziert werden konnte. Von Aminosäure 22 bis 41 unterscheiden sich Stamm HxN1 und Stamm OcN1 nur innerhalb einer Aminosäure, was zeigt, wie stark dieser Bereich konserviert ist. Die hohe Sequenzähnlichkeit in unmittelbarer Nachbarschaft zu dem Motiv ist auch bei den anderen GRE-Aktivasen zu sehen, wenn auch weniger ausgeprägt. Wie auch bei der

Betrachtung der Identität über die gesamte Sequenz der Aktivase, ist auch in dieser Teilsequenz die Übereinstimmung mit Lam, BioB und LipA am geringsten. Neben dem CXXCXXCXX-Motiv enthält die Aktivase von OcN1 zwei zusätzliche Motive für [Fe₄S₄]-Cluster an C⁵⁷MQCGTCARVC und C⁹⁶SYCMECVKAC, wie sie auch in HxN1 und anderen GRE-Aktivasen (Yu *et al.*, 2006) gefunden wurden.

22	F	R	T	A	V	F	L	K	G	C	S	M	R	C	A	W	C	H	N	P	ORF 7 OcN1
22	F	R	T	S	V	F	L	K	G	C	S	M	R	C	A	W	C	H	N	P	MasG HxN1
21	F	R	T	N	V	F	L	K	G	C	P	L	K	C	V	W	C	H	N	P	AssD1 AK-O1
71	F	R	T	T	V	F	L	K	G	C	P	L	K	C	P	W	C	H	N	P	BssD <i>Thauera</i> sp. strain DNT-1
63	F	R	T	T	V	F	L	K	G	C	P	L	R	C	P	W	C	H	N	P	TutE <i>Thauera aromatica</i> strain T1
20	I	R	T	T	I	F	L	K	G	C	P	L	R	C	P	W	C	H	N	P	BssD <i>Azoarcus</i> sp. strain T
20	I	R	T	T	I	F	L	K	G	C	P	L	H	C	P	W	C	H	N	P	BssD <i>Aromatoleum aromaticum</i> strain EbN1
20	I	R	T	T	I	F	V	K	G	C	P	L	H	C	P	W	C	H	N	P	BssD <i>Geobacter metallireducens</i>
20	I	R	T	T	I	F	L	K	G	C	P	L	R	C	P	W	C	H	N	P	BssD <i>Magnetospirillum</i> sp. TS-6
20	I	R	T	T	I	F	L	K	G	C	P	L	R	C	P	W	C	H	N	P	BssD <i>Thauera aromatica</i> K172
21	I	R	F	I	T	F	F	Q	G	C	L	M	R	C	L	Y	C	H	N	R	PflA <i>Escherichia coli</i> K12
21	I	R	F	I	L	F	M	Q	G	C	L	M	R	C	K	Y	C	H	N	R	PflA <i>Haemophilus influenzae</i>
38	I	R	T	L	V	F	L	K	G	C	P	L	V	C	P	W	C	S	N	P	DahB2 <i>Peleobacter carbinolicus</i>
24	I	R	S	I	V	F	F	K	G	C	P	M	S	C	L	W	C	S	N	P	DahB2 <i>Clostridium novyi</i> NT
25	C	R	T	T	V	F	L	N	G	C	P	L	S	C	K	W	C	A	N	P	HpdA <i>Clostridium difficile</i>
38	L	A	A	V	V	F	C	Q	G	C	P	W	R	C	G	Y	C	H	N	P	NrdG <i>Ralstonia eutropha</i> H16
116	R	V	L	L	L	I	T	D	M	C	S	M	Y	C	R	H	C	T	R	R	Lam <i>Clostridium subterminale</i>
44	T	L	L	S	I	K	T	G	A	C	P	E	D	C	K	Y	C	P	Q	S	BioB <i>Escherichia coli</i> K12
85	A	T	F	M	I	L	G	A	I	C	T	R	R	C	P	F	C	D	V	A	LipA <i>Escherichia coli</i> APEC01

C x x x C x x C

Abbildung 19: Partielles Alignment der N-terminalen Domäne mit dem Eisen-Schwefel-Cluster Bindungsmotiv (CxxxCxxC) der potentiellen Aktivase von Stamm OcN1 und anderen Proteinen der „Radical SAM Superfamily“

Aminosäuren, die mit ORF 7 von Stamm OcN1 übereinstimmen sind fett dargestellt. Das Alignment wurde mittels ClustalW mit DNASTAR (Lasergene) berechnet. Enzymnamen und Accession-Nummern sind identisch zu Abb. 18.

5. Unterscheidung von Alkan- und Aromatenabbauern mittels PCR

PCR basierte Methoden erlauben schnell erste Einblicke in Habitate, sowohl hinsichtlich der Diversität der Organismen (16S rRNA-Gen; Dolan, 2005), als auch möglicher Abbauleistungen. So wird das *bssA*-Gen in jüngster Zeit in Studien als Markergen zur Identifizierung von Toluol-abbauenden Organismen eingesetzt (Winderl *et al.*, 2007). Da bisher noch kein Mikroorganismus bekannt ist, der sowohl *n*-Alkane als auch Toluol als Wachstumssubstrat nutzen kann, ist eine Unterscheidung beider Gruppen unter Ausnutzung der genetischen Unterschiede innerhalb des aktivierenden Enzyms möglich. Für die Entwicklung der degenerierten Primer wurden die Sequenzen der großen *bss*-Untereinheit von *Thauera* sp. Stamm DNT-1, *Azoarcus* sp. Stamm T, *Magnetospirillum magnetotacticum*, *T. aromatica* K172 und *T. aromatica* Stamm T1 verglichen (~ 500 bp, Primer Nr. 148/149) und gegen die beiden zu dem Zeitpunkt bekannten Sequenzen der Alkanabbauer HxN1 und OcN1 (~1500 bp, Primer Nr. 147/159) abgegrenzt. Als Teststämme für die Primer wurden die Nitratreduzierer HxN1 und OcN1, sowie als Toluol verwertende Stämme *Aromatoleum aromaticum* Stamm EbN1 und pCyN1 eingesetzt. Hxd3 diente als Negativkontrolle, da für diesen Stamm ein anderer Abbauweg postuliert wird (Young und Phelps, 2005) und im Genom keine Hinweise auf ein *mas*-ähnliches Operon gefunden wurden (http://genome.ornl.gov/microbial/dpro_hx/02jul07/). Aus einem ClustalW-Alignment aller Sequenzdaten wurden generelle Screeningprimer auf mögliche „Fumarat-Additions“-Gene (~500 bp, Nr. 150/151) abgeleitet. Diese Primer wurden zusätzlich zu den oben genannten Stämmen an den Sulfatreduzierern Pnd3 und TD3 und *Desulfobacula toluolica* (Tol2) und OxyS1 getestet. Die PCR wurde an ganzen Zellen durchgeführt. Als Kontrolle für die PCR dienten allgemeine 16S Primer (fw: GM5 F (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'), rev: 907 R (5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT-3'), ~550 bp).

Tabelle 13: PCR-Screening zur Identifikation von Alkan- und Aromatenabbauern

Primer	Alkanabbauer					Toluolabbauer			
	HxN1	OcN1	Pnd3	TD3	Hxd3	EbN1	pCyN1	Tol2	OxyS1
147/159 (Alkanabbau)	+	+	n.d.	n.d.	-	-	-	n.d.	n.d.
148/149 (Toluolabbau)	-	-	n.d.	n.d.	-	+	+	n.d.	n.d.
150/151 (allgemein)	+	+	+	+	-	+	+	+	+

+: PCR Produkt erhalten; -: keine PCR Produkt erhalten; n.d.: nicht durchgeführt; fett: PCR an genomischer DNA (alle anderen an ganzen Zellen)

Wie Tabelle 13 zeigt, ist eine Abgrenzung von Alkan- und Toluol verwertenden Organismen mittels PCR möglich. Die gebildeten Produkte sind spezifisch für die jeweilige Abbaugruppe. Allerdings wurden hierbei nur Organismen eingesetzt die Nitrat als Elektronenakzeptor nutzen, d. h. die Primer decken möglicherweise nur einen geringen Teil der Alkanabbauer ab. Sicherlich wäre für die Alkan-Primer eine Neuentwicklung auf Basis der in dieser Arbeit generierten Sequenzdaten sinnvoll. Das Primerpaar zum generellen Screening für Fumarat-Addition zeigte mit allen Stämmen, mit Ausnahme der Negativkontrolle, ein positives Ergebnis und kann somit zur schnellen Identifikation wahrscheinlicher „Fumarat-Additions“-Gene eingesetzt werden, ohne jedoch das potentiell genutzte Substrat vorhersagen zu können. Es zeigte sich, dass für jeden Organismus die Annealing-Temperatur neu bestimmt werden muss. Die Temperatur für HxN1 und OcN1, anhand denen auch die Primersequenzen bestimmt wurden, liegt mit 53°C deutlich über der für TD3 und Pnd3 bestimmten Temperatur von 48°C. An diesen beiden Stämmen konnte nur an genomischer DNA ein PCR-Produkt amplifiziert werden, nicht jedoch an ganzen Zellen. Bei den Toluolabbauern lag die Annealing-Temperatur ebenfalls bei 48°C. Auch Primer für ein generelles Screening könnten durch die in den letzten Jahren veröffentlichten Alkan- und Toluol-Sequenzen, sowie durch Sequenzdaten anderer durch Fumarat-Addition aktivierter Substrate (z. B. 2-Methylnaphthalin; Musat *et al.*, 2009), erweitert werden.

6. Entwicklung und Validierung eines Aktivitätstests für die Methylalkylsuccinat-Synthase von Stamm HxN1

Der Aktivitätstest wurde wie unter 4.10.1 (Material und Methoden) beschrieben durchgeführt. Als Grundlage für die Berechnung der Enzymaktivität diente die gebildete Menge an Methylpentylsuccinat (MPS). MPS entsteht aus der Addition von Hexan an Fumarat und bildet somit das erste Produkt im anaeroben Abbau von Hexan. Die gaschromatographische Analyse gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS) des Reaktionsproduktes erfolgte wie unter 4.10.2 (Material und Methoden) beschrieben. Zur Identifikation von MPS wurden die Spektren mit der Retentionszeit und dem Massenspektrum eines synthetisierten MPS-Standards (in Form des Dimethylesters) und dem veröffentlichten Massenspektrum (Rabus *et al.*, 2001) verglichen. Die Retentionszeit des Standards lag bei 7,9 min, wohingegen in den Aktivitätsansätzen zwei Peaks mit dem für MPS charakteristischen Spaltungsmuster auftraten. Die beiden Verbindungen eluierten nach 7,9 min bzw. 10,5 min, wobei der Peak nach 7,9 min eine sehr geringe Intensität aufwies und deshalb nicht in allen Proben detektiert werden konnte. Zur Überprüfung der Daten wurden Proben zu Dr. Heinz Wilkes (GeoForschungsZentrum, Potsdam) geschickt. Hier konnte der Peak nach 10,3 min als die 1-fach methylierte Form der MPS identifiziert werden, wohingegen nach 7,9 min, wie erwartet, der Dimethylester eluiert. Abbildung 20 (A) zeigt exemplarisch das Elutionsprofil einer Aktivitätsprobe nach 24 h Inkubationszeit in der sowohl die 1-fach methylierte, als auch die 2-fach methylierte Form von MPS auftraten. Die entsprechenden MS-Spektren (B) und mögliche Fragmentierungsmuster (Abb. 21, A und B) der jeweiligen Ester sind mit abgebildet. In der Nullkontrolle, die direkt nach Reaktionsbeginn abgestoppt wurde, konnte dagegen kein MPS detektiert werden.

A

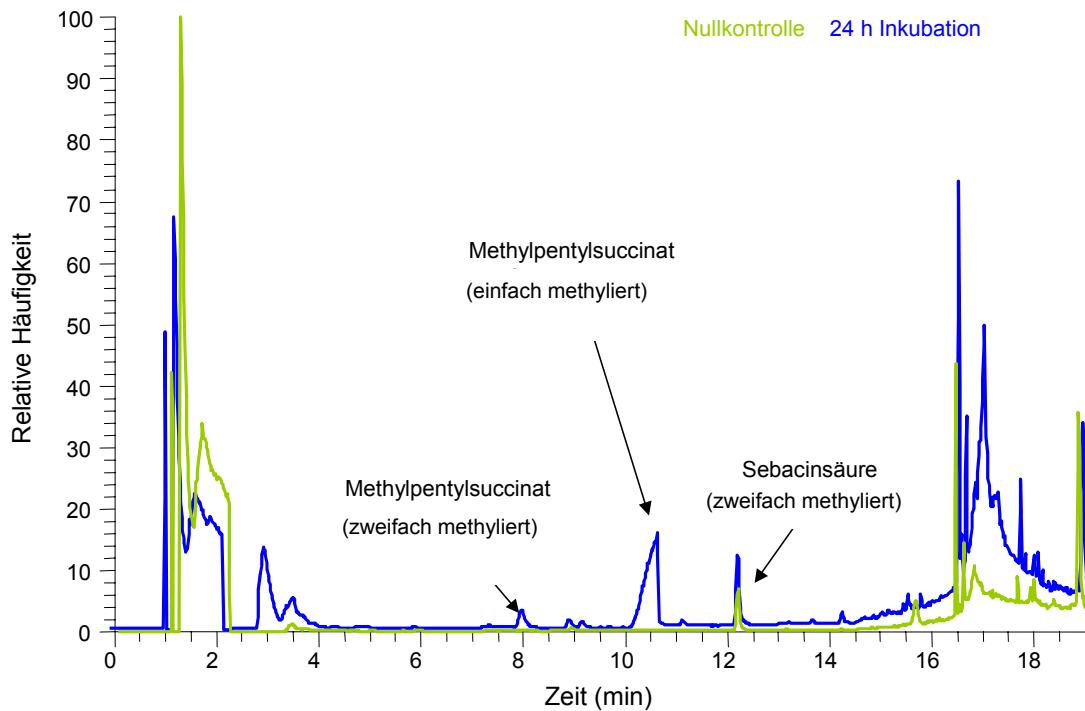


Abbildung 20: Elutionsprofil und MS-Spektren von Methylpentylsuccinat

A, GC-MS Elutionsprofil einer Methylalkylsuccinat-Synthase-Aktivitätsprobe. Der Dimethylester des Reaktionsproduktes (Methylpentylsuccinat) eluiert nach 7,9 min, der relativ häufiger gebildete Methylester nach 10,3 min. Als interner Standard wurde Sebacinsäure verwendet. Die Sebacinsäure wurde immer vollständig methyliert. Die Nullkontrolle (0 h Reaktionszeit) zeigt keine Produktbildung.

(Teil B, Elutionprofile siehe Folgeseite)

B

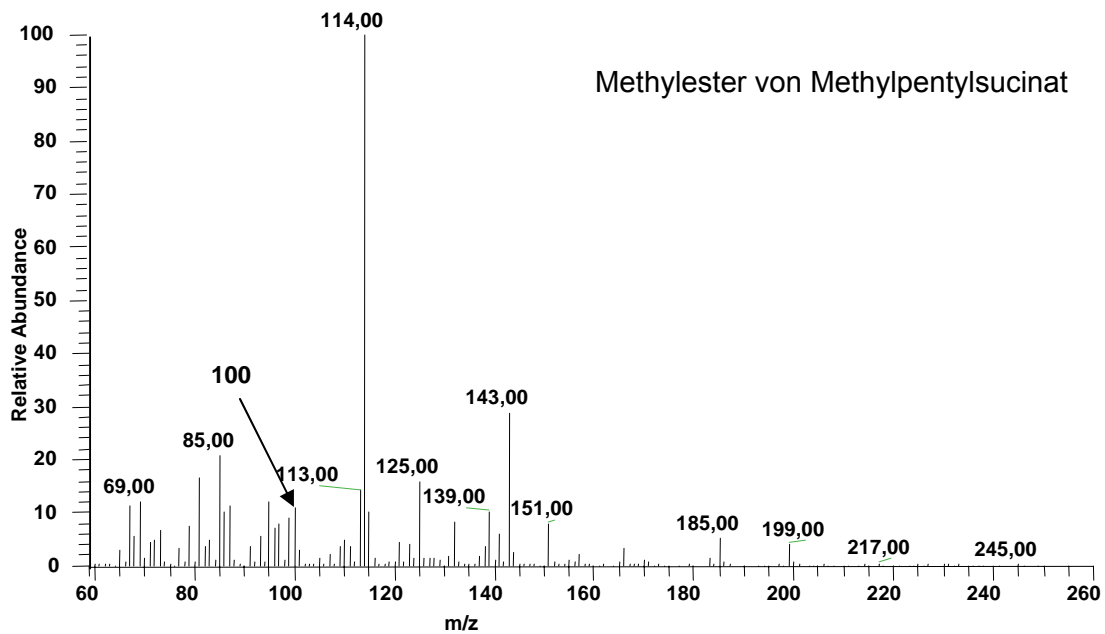
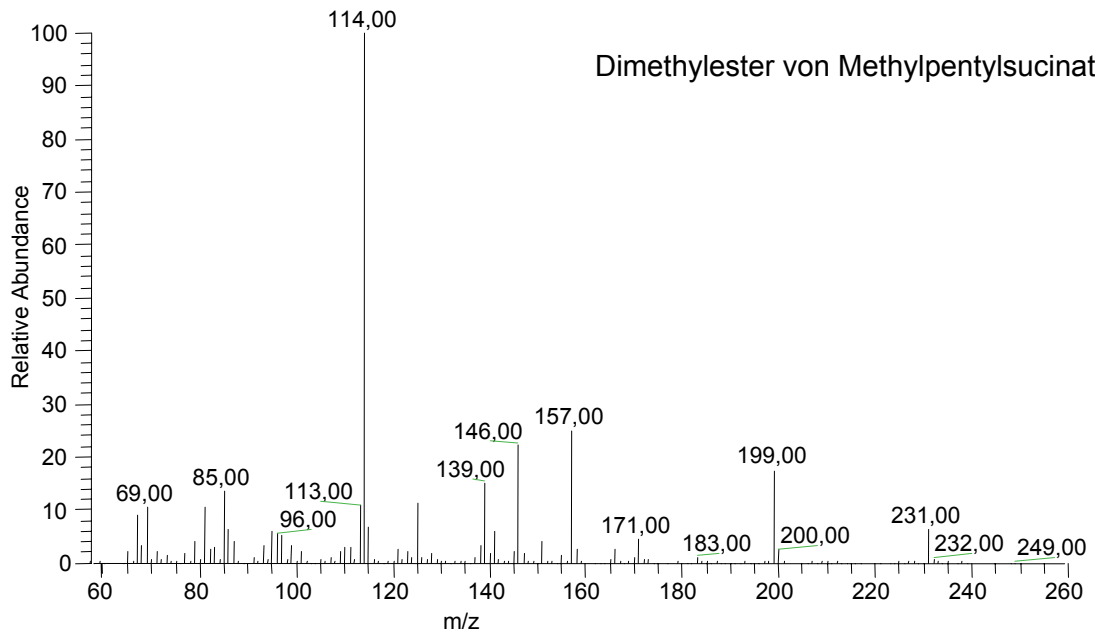
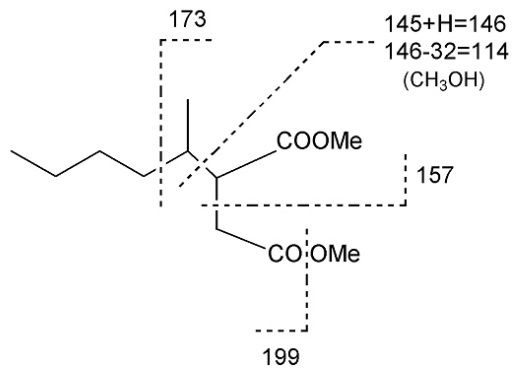


Abb. 20: Elutionsprofil und MS-Spektren von Methylpentylsuccinat (Teil B)

B, MS-Spektren des Dimethylesters (7,9 min Retentionszeit) und des Methylesters (10,3 min Retentionszeit) von Methylpentylsuccinat. Das m/z Ion 100 tritt nur bei unvollständiger Methylierung auf, das für die Verbindung charakteristische m/z 114 Ion stellt bei beiden MPS-Formen das Hauption dar.

A)



B)

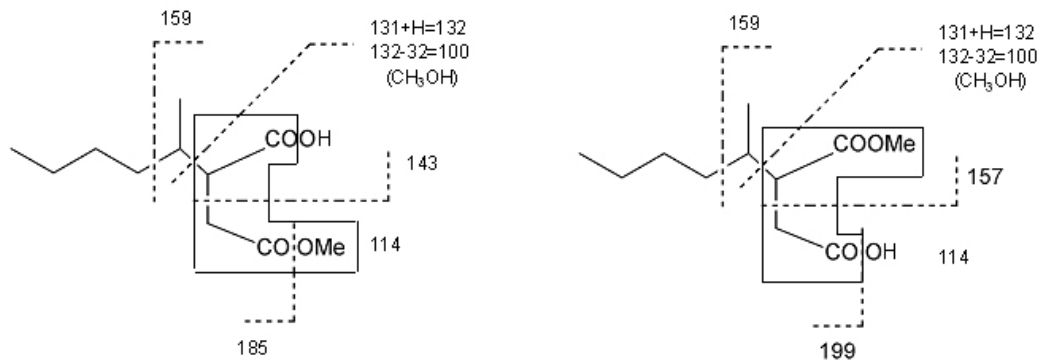


Abbildung 21: Fragmentierungsmuster potentieller Ester von Methylpentylsuccinat
(A) Methylpentylsuccinat-Dimethylesters; (B) mögliche Methylpentylsuccinat-Methylester. Der Kasten markiert m/z 114 Peaks, die bei den einfach methylierten Formen entstehen können.

Die Methylierungsreaktion in den Aktivitätsansätzen wurden, im Gegensatz zu den Extraktionsversuchen von Rabus *et al.* (2001), nicht mit Diazomethan als Derivatisierungsmittel durchgeführt, sondern mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH). Der Grund hierfür ist die wesentlich bessere Handhabbarkeit von TMSH bei großem Probendurchsatz in möglichst kurzer Zeit, was für eine spätere Aktivitätsmessung bei der Proteinreinigung essentiell ist. Problematischer Weise scheint die Methylierung mit TMSH nur unvollständig abzulaufen, da kaum die Bildung des Dimethylesters beobachtet wurde. Aufgrund dieser Tatsache erfolgte die Bestimmung der gebildeten MPS-Konzentration über die Fläche des Peaks nach 10,5 min (einfach methylierte Form der MPS) im Totalionenstrom (TIC). Für eine stabilere Quantifizierung wurde zusätzlich Sebacinsäure, ein Konstitutionsisomer des Methylpentylsuccinats, als interner Standard verwendet. In Vorversuchen hatte sich nämlich gezeigt, dass im Zuge der vielschrittigen

Probenvorbereitung größere Abweichungen in den Replikaten auftraten. Diese Abweichungen konnten mit Hilfe des internen Standards minimiert werden. Die Sebacinsäure wird hierzu vor der Methylierung der Proben mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) zugesetzt. Im Gegensatz zum MPS wird die Sebacinsäure dabei vollständig methyliert. Die Retentionszeit der methylierten Sebacinsäure lag bei ca. 11,9 min und wurde über einen kommerziell erhältlichen Standard bestätigt, der auch einen Vergleich der MS-Daten ermöglichte. Weiterhin wurden die Proben bei zu geringer Konzentration an MPS ($\leq 20 \mu\text{M}$) nicht über die Fläche des MPS-Methylesters im TIC quantifiziert, da der Hintergrund das Ergebnis zu stark beeinflusste, sondern erfolgte in diesen Fällen über die Fläche des m/z 114-Ions, die ins Verhältnis zur Fläche im TIC gesetzt wurde. Proben mit einer hohen MPS-Konzentration (geringer Einfluss des Hintergrunds) zeigen ein Verhältnis des m/z 114-Ions zum TIC von 1:17. Zur Quantifizierung niedriger Konzentrationen von MPS wurde die Fläche des m/z 114-Ions mit siebzehn multipliziert, um so auf die Fläche im TIC zurückzuschließen.

Die wichtigsten auftretenden Ionen bei der Spaltung von MPS sind in Tab. 14 aufgeführt. Charakteristisch ist das m/z Ion 114, welches durch die Abspaltung und Fragmentierung von Succinat gebildet wird. Wie in den bereits beschriebenen MS-Daten (Rabus *et al.*, 2001), stellte das m/z -Ion 114 in den mit dem GCQ Thermo Finnigan MAT-Gerät erzeugten Massenspektren das Hauption dar. Die 2-fach methylierte Form des MPS zeigte dabei ein sehr ähnliches Fragmentierungsmuster zu den veröffentlichten Daten. Es traten dort die gleichen Ionen mit ähnlichen relativen Häufigkeiten auf. Der einzige Unterschied lag beim m/z Ion 146 (alt: 40,6%, neu: 22,2% relative Häufigkeit), so dass die Verbindung zweifelsfrei an Hand des Spektrums identifiziert werden konnte. Unterschiede im Spaltmuster traten dagegen bei der 1-fach methylierten Form auf, in der keine m/z Ionen von 199 bzw. 157 vorkamen. Statt dessen traten ein m/z 185 und m/z 143-Ion auf. Diese beiden Ionen entstehen analog, wenn nur eine Carboxylgruppe methyliert wird (siehe Abb. 21). Eine weitere Bestätigung, dass es sich bei der Verbindung nach 10,5 min um den Methylester von MPS handelt, lieferte das zusätzliche Auftreten des m/z -Ions 100. Auch dieses Ion würde man nur bei einer unvollständigen Methylierung neben dem m/z - Ion 114 erwarten, unabhängig davon, an welcher Stelle im Molekül der Ester gebildet wurde. Eine zweifelsfreie Aussage darüber, ob immer nur eine bestimmte Carboxylgruppe methyliert wurde (präferierte Carboxylgruppe zur Esterbildung), ist aufgrund der Fragmentierungsmuster nicht

möglich. Bei keinem der beiden MPS-Formen konnte ein Molekül-Ion bzw. ein M⁺-Ion detektiert werden. Mögliche isomere Formen der MPS, wie in Rabus *et al.* (2001) beschrieben, konnten ebenfalls nicht beobachtet werden.

Tabelle 14: Massenspektrum-Daten für MPS (Methylester und Dimethylester)

Zur Reduktion des Hintergrundes wurde von allen Spektren das Spektrum eines inaktiven Rohextraktes abgezogen. Berücksichtigt wurden alle Ionen mit einer Häufigkeit von 15% des Maximums.

Retentionszeit (min)	Wichtige Ionen (% des Maximums)	Verbindung	Referenz
7,9	199 (17,6), 157 (25,0), 146 (22,2), 114 (100)	Methylpentylsuccinat (Dimethylester)	diese Arbeit
10,5	143 (28,7), 125 (16,0), 114 (100), 85 (20,9), 81 (16,7)	Methylpentylsuccinat (Methylester)	diese Arbeit
nicht vergleichbar	199 (11,0), 157 (27,5), 146 (40,6), 114 (100), 55 (12,3)	Methylpentylsuccinat (Dimethylester)	Rabus <i>et al.</i> , 2001

6.1. Einfluss von Nitrit auf die gemessene Enzymaktivität im Rohextrakt

Zur Bestimmung der höchsten Aktivität des Enzyms über den Wachstumsverlauf wurde HxN1 im 20 Liter-Maßstab anaerob mit Hexan als Kohlenstoffquelle kultiviert. Die Kultur wurde zunächst mit einer konstanten Nitratzugabe von 0,5 mM/h angezogen und der Nitratzufluss im weiteren Wachstumsverlauf variiert. Die Probennahme erfolgte mittels einer diskontinuierlichen Ernte-Methode, wobei die Nitrat- und Nitritkonzentration mittels HPLC bestimmt wurde. Im Kulturmedium wurde innerhalb der ersten 8 h unter steigender Nitratzugabe (bis zu 1 mM/h) kein Nitrat und Nitrit detektiert, d. h. es fand ein sofortiger Umsatz des Nitrat und Nitrit zu weiteren Produkten der Denitrifikation in den Zellen statt. Gleichzeitig verdoppelte sich die optische Dichte der Kultur, was ein weiteres Zeichen für die „Fitness“ der Zellen ist. Allerdings konnte auffälligerweise während dieses Zeitraums keine bzw. nur eine geringe Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase in *in vitro*-Assays nachgewiesen werden (siehe Abb. 22). Nach ca. 8 ¼ h kam es zu einer Anhäufung von Nitrat und Nitrit im Medium; so dass die Nitratzufuhr gestoppt wurde. Die Anhäufung von Nitrit führte zu einer geringen Beeinträchtigung des

Kulturwachstums, die optische Dichte sank leicht ab, blieb dann aber über die restliche Versuchszeit konstant. Ca. 30 min nachdem die Nitratzufuhr gestoppt wurde, konnten weder Nitrat noch Nitrit im Medium detektiert werden und es wurde erneut kontinuierlich Nitrat (0,5 mM/h) zugeführt. Die höchste *in vitro* Aktivität zeigte sich zu dem Zeitpunkt, an dem kein Nitrat zugeführt wurde und kein Nitrat oder Nitrit im Medium nachweisbar waren. Dagegen sank die Aktivität des Enzyms bei einem Anstieg von Nitrat im Medium erneut. Das Protein konnte aber zu allen Probenahmepunkten über SDS-PAGE in der Kultur in ungefähr gleicher Menge identifiziert werden (Daten nicht gezeigt), was eine verstärkte Induktion des Proteins in einer bestimmten Wachstumsphase in diesem Versuch ausschließt. Möglicherweise variiert die Menge an aktiviertem Methylalkylsuccinat-Synthase-Enzym (mit Radikal in der Seitenkette), jedoch konnte, entgegen dieser Theorie, bei hoher *in vivo* Enzymaktivität (schneller Nitratumsatz, Verdopplungszeit von ca. 8 h) die geringste *in vitro* Aktivität detektiert werden. Daher ist ein negativer Effekt von Nitrat bzw. Produkten der Nitratreduktion während des Zellaufschlusses auf die Aktivität des Enzyms wahrscheinlicher. Aus diesem Grund wurden alle nachfolgenden Zellernten nicht während der Log-Phase der Kulturen durchgeführt, sondern erst, nachdem die Kultur ohne Nitratzufuhr über 3-4 h für Nitrat und mögliche Reduktionsprodukte „ausgehungert“ wurde.

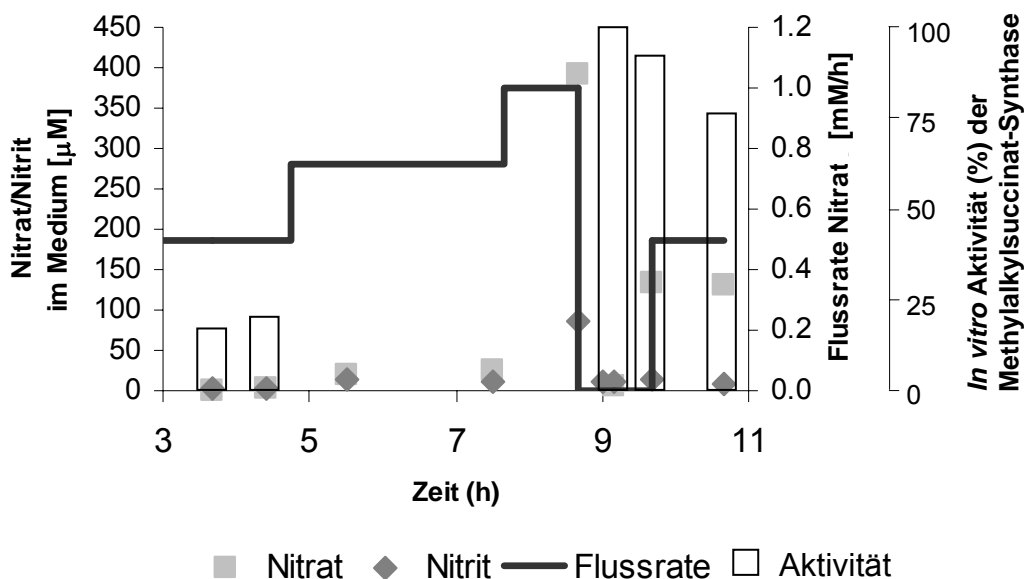


Abbildung 22: Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase während des Wachstums von Stamm HxN1

Es wurden während des Wachstums von Stamm HxN1 Proben genommen, die auf Nitrat-, Nitrit- (über HPLC) und Methylpentylsuccinat-Gehalt (über GC-MS) untersucht wurden. Die größte *in vitro* Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase zeigte sich bei „Nitrat ausgehungerten“ Zellen, die kein Nitrat und Nitrit im Medium enthielten und nicht kontinuierlich mit Nitrat versorgt wurden.

6.2. Einfluss von NO auf die Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase

Für die gereinigte Benzylsuccinat-Synthase (equivalentes Startenzym aus dem anaeroben Toluolabbau) wurde eine komplette Hemmung durch eine 280 μM NO-Lösung im Rohextrakt beschrieben (Feil, 2006). Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der vermeintlichen Korrelation von Nitrat (oder Reduktionsprodukten von Selbigen) und der Methylalkylsuccinat-Synthase-Aktivität während des Wachstums lässt sich für die Methylalkylsuccinat-Synthase ebenfalls eine Inaktivierung durch z. B. NO (als Produkt der Denitrifikation) vermuten. Um dies näher zu untersuchen wurde in Doppelbestimmungen aktiver Rohextrakt von HxN1 mit unterschiedlichen Konzentrationen von mit NO-gesättigtem Wasser (NO-Konzentration im Wasser ca. 2 mM) verdünnt. Um durch Verdünnungen bedingte Aktivitätsverluste bestimmen zu können, wurde in Kontrollansätzen die Aktivität bei einer entsprechenden Verdünnung mit Wasser geprüft. Die gebildete Konzentration an Methylpentylsuccinat (MPS) im Rohextrakt ohne Verdünnung wurde dafür auf 100% gesetzt. Bei einer Endkonzentration

von 0,5 mM NO im Ansatz ist die Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase um ca. 25% geringer, als in der Kontrolle. Bei 1 mM NO verstärkt sich dieser Effekt weiter (42% Aktivitätsverlust). Allerdings zeigten sich keine Aktivitätsunterschiede bei einer NO-Konzentration von 1,5 mM im Ansatz. Inwieweit dies auf den starken Verdünnungsfaktor zurückzuführen ist oder andere Effekte eine Rolle spielen, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Im Gegensatz zur Benzylsuccinat-Synthase konnte für die Methylalkylsuccinat-Synthase keine komplette Inhibierung durch NO beobachtet werden. Des Weiteren zeigten niedrige NO-Konzentrationen (Endkonzentration 50 μ M und 100 μ M) keinen Einfluss auf die Aktivität. Eventuell reagiert sich NO aber aufgrund seiner hohen Reaktivität an anderen Bestandteilen des Rohextrakts ab, so dass nur eine sehr viel geringere Konzentration wirklich auf die Methylalkylsuccinat-Synthase einwirken kann, was zu einer Verfälschung des Ergebnisses führt. Deshalb müsste der Versuch, um eine verlässlichere Aussagen treffen zu können, nochmals mit gereinigter Methylalkylsuccinat-Synthase durchgeführt werden.

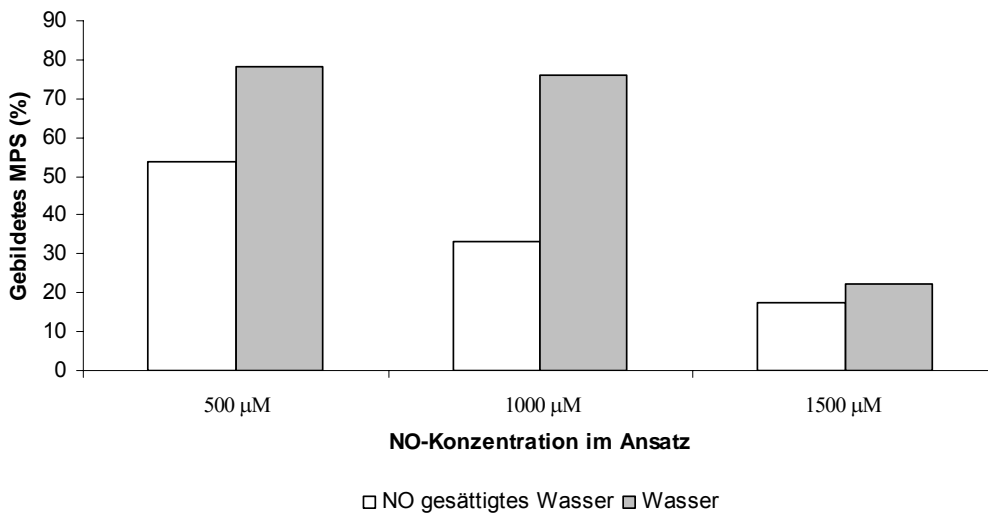


Abbildung 23: Einfluss von NO auf die Methylalkylsuccinat-Synthase-Aktivität
 Die Testansätze wurden mit NO-gesättigtem Wasser auf Endkonzentrationen von 500 μ M bis 1500 μ M NO verdünnt. Als Kontrolle dienten Ansätze, die nur mit Wasser verdünnt wurden. Die Konzentration an Methylpentylsuccinat einer unverdünnten Probe wurde auf 100% gesetzt.

6.3. Optimierung der Aktivitätstest-Bedingungen im Rohextrakt

6.3.1. Bestimmung der optimalen Fumarat-Konzentration

Die Bestimmung der optimalen Fumarat-Konzentration in dem Aktivitätstest ist von großer Bedeutung, da Fumarat als Substrat bei der Bildung von Methylpentylsuccinat (MPS) dient. Daher wurden in den Testansatz variierende Fumarat-Konzentrationen von 2,5 mM – 60 mM zugesetzt. Die höchste Aktivität zeigte sich bei einer Fumarat-Konzentration von 40 mM. Höhere Konzentrationen führten nicht zu einer erhöhten Produktbildung, inhibitorische Effekte wurden dadurch nicht beobachtet (siehe Abb. 24). Der relativ hohe Bedarf an Fumarat, verglichen mit der Konzentration des gebildeten Methylpentylsuccinats (85 μ M), lässt sich über die zentrale Rolle von Fumarat im Stoffwechsel erklären. Als zentrales Metabolit finden evtl. Umsetzungen von Fumarat durch andere, im Rohextrakt noch aktive Enzyme (z. B. ATP-unabhängige Fumarase im Citratzyklus), statt. Daher wird für den Aktivitätstest im Rohextrakt eine hohe Konzentration an Fumarat benötigt, welche gegebenenfalls im gereinigten Methylalkylsuccinat-Synthase-Enzym gesenkt werden kann.

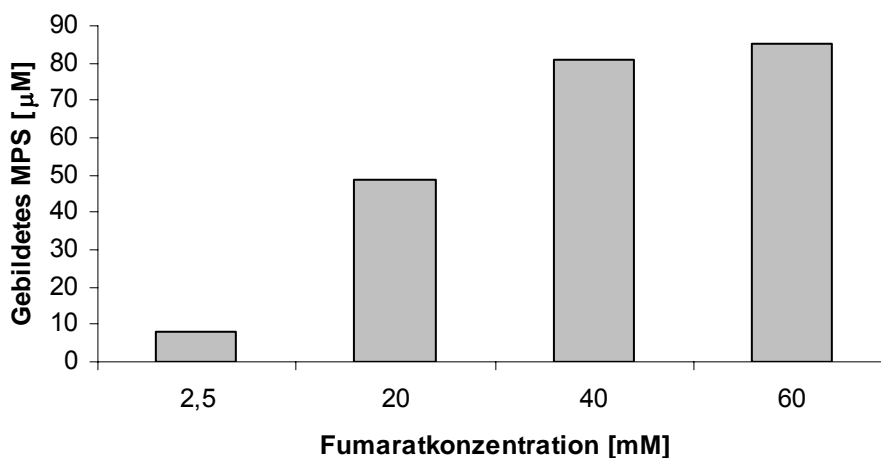


Abbildung 24: Bestimmung der optimalen Fumarat-Konzentration für den Methylalkylsuccinat-Synthase Aktivitätstest im Rohextrakt

Es wurden steigende Konzentrationen an Fumarat in den Testansätzen eingesetzt die zusätzlich 6% Hexan, 4 mM Dithiothreitol (DTT) und 0,5 mM Dithionit enthielten. Die Ansätze wurden mittels GC-MS auf Methylpentylsuccinat (MPS) Bildung untersucht.

6.3.2. Einsatz verschiedener Reduktionsmittel

Der Einfluss verschiedener Reduktionsmitteln auf die Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase wurde durch Kombination steigender Konzentrationen von Titancitrat mit Dithionit und Dithiothreitol (DTT) untersucht (siehe Abb. 25). Die Ansätze wurden dabei über Nacht inkubiert. Unabhängig von der eingesetzten Konzentration des Reduktionsmittels und der Kombination selbiger lag die gebildete Methylpentylsuccinat-Konzentration (MPS) in allen Ansätzen bei ca. 120 μ M. Eine ähnliche Aktivität konnte auch ohne Titancitrat nur mit 5 mM DTT und 4 mM Dithionit (Abb. 25, Nr. 3) detektiert werden, allerdings mit stark schwankenden Messergebnissen. Bei Aktivitätsansätzen, in denen Kombinationen von DTT (0,5 mM - 4,5 mM) und Dithionit (1 mM - 3 mM) jedoch in geringerer Konzentration eingesetzt wurden, nahm die Produktbildung messbar ab (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Daten scheint somit das Reduktionsmittel selbst von geringerer Bedeutung zu sein. Vielmehr ist nur das gesamte Reduktionspotential des Puffers ausschlaggebend für die Aufrechterhaltung der Enzymaktivität. Dennoch war die Enzymaktivität und Reproduzierbarkeit mit 4 mM Titancitrat, 5 mM DTT und 4 mM Dithionit in diesem Versuch am Besten (Abb. 25, Nr. 2c). Spätere Versuche ergaben allerdings, dass die Konzentrationen von DTT auf 4 mM und von Dithionit auf 2 mM ohne Aktivitätsverluste gesenkt werden können, so dass diese Kombination für weitere Versuche eingesetzt wurde.

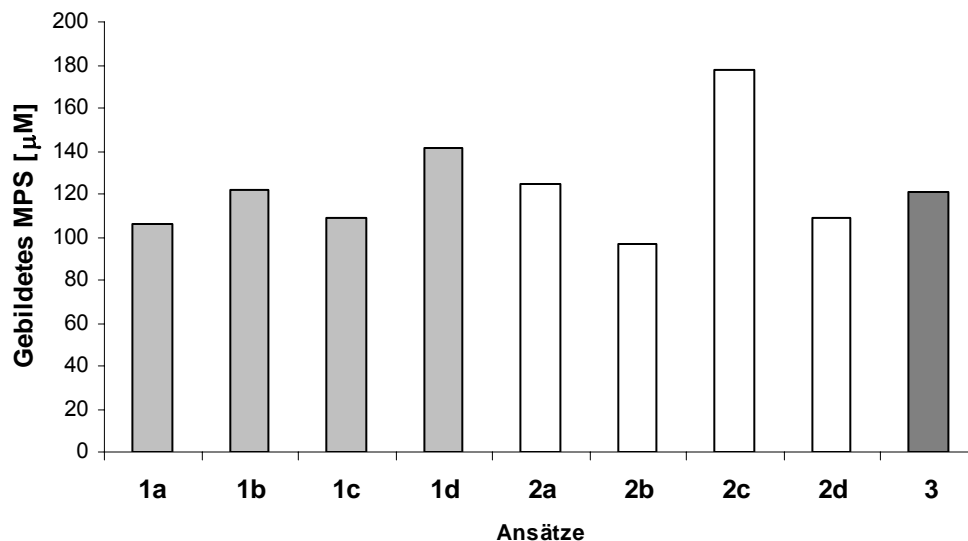


Abbildung 25: Einfluss verschiedener Reduktionsmittel auf die Methylalkylsuccinat Synthase-Aktivität

In den Aktivitätstest wurden steigende Konzentrationen an Titan(III)-Citrat bei unterschiedlichen Dithiothreitol (DTT) und Dithionit-Konzentrationen eingesetzt. Die Fumarat-Konzentration betrug 40 mM. Die Ansätze wurden mittels GC-MS auf Methylpentylsuccinat (MPS) Bildung untersucht. 1a, 1 mM Titancitrat, 1 mM DTT; 1b, 2 mM Titancitrat, 1 mM DTT; 1c, 4 mM Titancitrat, 1 mM DTT; 1d, 6 mM Titancitrat, 1 mM DTT. 2a, 1 mM Titancitrat, 5 mM DTT, 4 mM Dithionit; 2b, 2 mM Titancitrat, 5 mM DTT, 4 mM Dithionit; 2c, 4 mM Titancitrat, 5 mM DTT, 4 mM Dithionit; 2d, 6 mM Titancitrat, 5 mM DTT, 4 mM Dithionit. 3, 5 mM DTT, 4 mM Dithionit.

6.3.3. Verfügbarkeit von Hexan

Der Verfügbarkeit von Hexan als Substrat der Enzymreaktion kommt in dem Aktivitätstest große Bedeutung zu. Dabei war zum einen ein möglicher toxischer Effekt von Hexan, zum anderen eine Limitierung des Hexans im Versuchsansatz auszuschließen. In ersten Ansätzen wurde 1% (v/v) Hexan direkt zu den Proben zugegeben. Dies entspricht in einem 500 μl Ansatz einer Menge von 3,3 mg. Die in diesen Ansätzen detektierte Konzentration von 120 μM Methylpentylsuccinat (MPS) entspricht, unter Berücksichtigung, dass ein Molekül Hexan pro gebildetem Molekül MPS verbraucht wird, einem Hexan-Bedarf von 5,16 μg . Somit sollte Hexan im Überschuss vorgelegen haben und ist damit nicht limitierend für die Reaktion. Allerdings beträgt die maximale Löslichkeit von Hexan in Wasser lediglich 9,5 mg/l (Mackay und Shiu, 1981), d. h. in einem Ansatz sind maximal 4,75 μg Hexan gelöst. Nur gelöstes Hexan steht für die Reaktion zur Verfügung und muss im Reaktionsverlauf in die wässrige Phase nachdiffundieren. Da Hexan leicht flüchtig ist und bei einem zu

pipettierendem Volumen von nur 5 μl eine hohe Fehlerrate des tatsächlichen Volumens erwartet wurde, wurde die Hexan-Konzentration in den Ansätzen auf 6% (v/v) erhöht, ohne dass dabei ein denaturierender Effekt durch Hexan festgestellt werden konnte.

Um die Verfügbarkeit des Hexans in der wässrigen Phase weiter zu erhöhen wurden α -, β - und γ -Cyclodextrin als mögliche Komplexbildner mit Hexan getestet. Cyclodextrine, die durch enzymatischen Abbau von Stärke entstehen, bilden aufgrund ihrer Struktur einen hydrophoben Hohlraum aus, in den lipophile Moleküle eingelagert werden (Hanna *et al.*, 2004) können. Dadurch kann die Diffusionsstrecke verkürzt und damit die Verfügbarkeit von Hexan in der wässrigen Phase erhöht werden. Aufgrund des Hohlraumdurchmessers von ca. 4,7 Ångström würde sich für Hexan vor allem α -Cyclodextrin (6 Glucosemoleküle) eignen. Dies konnte auch schon durch die Stimulation des Wachstums auf Hexadecan für Stamm Hxd3 mit 5 mM α -Cyclodextrin im Medium nachgewiesen werden (Aeckersberg *et al.*, 1998). In den Methylalkylsuccinat-Synthase-Testansätzen betrug die Konzentration aller Cyclodextrine 8 mM; es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 4 $\frac{1}{2}$ h. Wie Abb. 26 zeigt, stieg die Konzentration an gebildetem MPS in dem Ansatz mit α -Cyclodextrin (Abb. 26, Nr.2) gegenüber dem Kontrollansatz (6% (v/v) Hexan, ohne Cyclodextrin (Abb. 26, Nr.1)) um ca. 50%. Bei den Proben mit β - und γ -Cyclodextrin dagegen sank die gebildete Produktmenge leicht um 10-20%. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Aeckersberg *et al.*, 1998, wo ebenfalls keine Anregung des Wachstums von Stamm Hxd3 durch β - und γ -Cyclodextrin detektiert werden konnte. Jedoch entspricht die gemessene MPS-Konzentration auch in den Ansätzen mit α -Cyclodextrin nicht der theoretisch zu erwartenden Aktivität der wachsenden Zellen und wurde daher nicht weiter verfolgt. Dafür war die gemessene Erhöhung der Mas-Aktivität zu gering im Vergleich zum Aufwand. Zusätzlich wurde für den Aktivitätstest der Methylalkylsuccinat-Synthase die Zugabe von Hexan in einer inerten Oberphase (5% (v/v) Hexan in HMN) getestet, wie sie auch bei der Zellanzucht verwendet wird. Allerdings konnte in der Rohextrakt-Phase nur eine verringerte Konzentration an MPS detektiert werden.

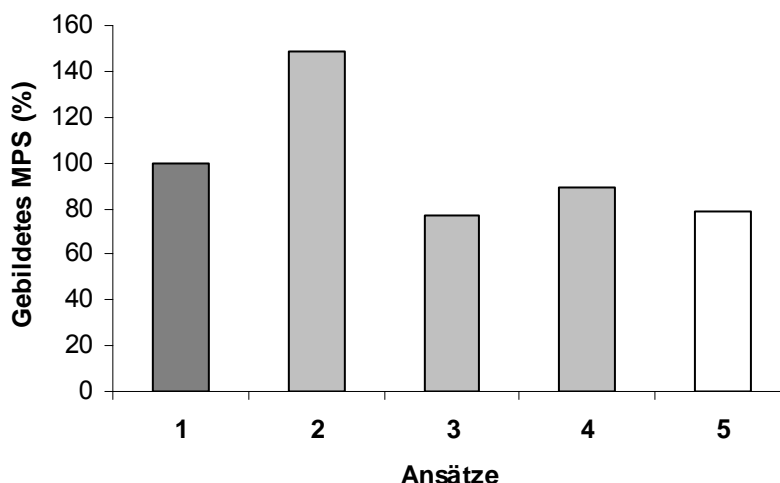


Abbildung 26: Einfluss von Cyclodextrinen und HMN auf die Bildung von Methylpentylsuccinat (MPS)

Allein durch den Einsatz von α -Cyclodextrin (Endkonzentration 8 mM) konnte die Bildung von MPS gegenüber dem Kontrollansatz gesteigert werden. Die Detektion von MPS erfolgte über GC-MS Messungen. **1**, Kontrollansatz mit 6% (v/v) Hexan (100%); **2**, 6% (v/v) Hexan, 8 mM α -Cyclodextrin, **3**, 6% (v/v) Hexan, 8 mM β -Cyclodextrin; **4**, 6% (v/v) Hexan, 8 mM γ -Cyclodextrin; **5**, 5% (v/v) Hexan in HMN. Die Fumarat-Konzentration betrug in allen Ansätzen 40 mM.

6.4. Bestimmung der Methylalkylsuccinat-Synthase-Aktivität im Zeitverlauf

Um den linearen Produktbildungsbereich zu erfassen, wurden von einem 15 ml Aktivitätsansatz regelmäßig Proben entnommen und diese auf gebildetes Methylpentylsuccinat (MPS) untersucht. Dieses wurde mit Rohextrakten aus unterschiedlichen Zellernten wiederholt. Ein exemplarischer Zeitverlauf ist in Abb. 27 dargestellt. Abhängig vom jeweiligen Rohextrakt variierte die Konzentration an MPS zu den jeweiligen Probenahmezeitpunkten stark. Jedoch zeigten alle Zeitverläufe eine Anlaufphase (lag-Phase), in der nur eine geringe MPS-Bildung stattfand. Im Anschluss an die lag-Phase folgte eine Phase in der die Konzentration an MPS linear zunahm. Die Dauer der einzelnen Phasen variierte dabei relativ stark abhängig vom eingesetzten Rohextrakt. Auf Grundlage des linearen Produktbildungsbereiches (schwarz gekennzeichnete Bereich in Abb. 27) konnte die spezifische Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase im Rohextrakt berechnet werden. Die Enzymaktivität lag, je nach Rohextrakt, bei $0,004\text{--}0,027 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{Protein}})^{-1}$. Nach der linearen Phase war die Produktbildungsrate deutlich verlangsamt. Auch über Nacht war noch eine Zunahme

der MPS-Konzentration messbar (ca. 25-30%). Dies deutet auf eine hohe Stabilität der Methylalkylsuccinat-Synthase unter den Versuchsbedingungen hin. Als Kontrollen wurden ein Ansatz ohne Hexan sowie ein Ansatz mit durch Sauerstoff inaktiviertem Enzym verwendet. Die Sauerstoffempfindlichkeit des Enzyms war aufgrund der Ähnlichkeit zur Benzylsuccinat-Synthase postuliert worden, die durch 20-30 Sekunden Luftkontakt inaktiviert wird (Leuthner *et al.*, 1998). Zur Inaktivierung der Methylalkylsuccinat-Synthase wurde der Rohextrakt an der Luft dreimal durch eine Spritze gezogen und anschließend 6% (v/v) Hexan zugesetzt. In beiden Kontrollen konnten auch nach 8 h Inkubationszeit nur sehr geringe Konzentrationen (< 3 μM , genauso wie der Wert nach Null Minuten) von MPS detektiert werden, so dass bei der Methylalkylsuccinat-Synthase ebenfalls von einer hohen Sauerstoffempfindlichkeit ausgegangen werden kann. Die Detektion geringer Mengen an MPS in den Kontrollen kann durch Hexan-Reste im Rohextrakt bzw. durch zuvor (während des Wachstums) von den Zellen gebildetes MPS erklärt werden, welches beim Aufschluss noch in den Zellen vorlag und während der Reaktion nicht weiter umgesetzt wurde.

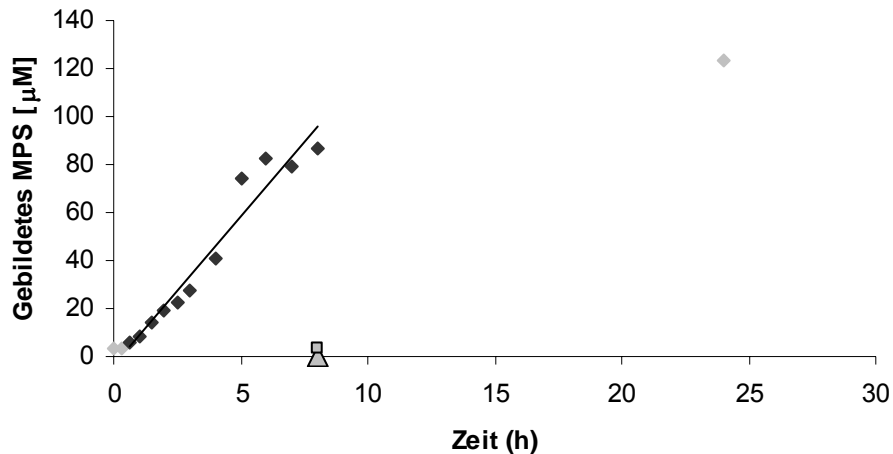


Abbildung 27: Methylalkylsuccinat-Synthase-Aktivität im Zeitverlauf

Nach einer lag-Phase mit nur geringer Methylpentylsuccinat (MPS)-Bildung nahm die Konzentration von MPS linear zu (dunkelgrau, mit linearer Trendkurve), bevor sie nach ca. 8 h ein Plateau erreichte. Kontrollen ohne Hexan (\square) und mit inaktiviertem Enzym (\triangle) zeigten keine Bildung von MPS.

6.5. Temperaturabhängigkeit der Methylalkylsuccinat-Synthase

Das Temperaturspektrum der Methylalkylsuccinat-Synthase wurde im Rohextrakt bestimmt. Die 1 mL Ansätze enthielten 40 mM Fumarat, 6% (v/v) Hexan und wurden für 4 h im Wasserbad (ohne Schütteln) inkubiert. Dabei wurden Temperaturen von 8,4°C bis 41,4°C im Abstand von ca. 3°C untersucht. Negativkontrollen ohne Hexan wurden bei 26,7°C und 41,5°C inkubiert, zeigten untereinander jedoch keinen signifikanten Unterschied. Allerdings lag der Mittelwert der Negativkontrollen mit 23,5 µM MPS in den Ansätzen deutlich höher als in anderen Versuchen, jedoch unter den Werten, die bei den verschiedenen Temperaturen gemessen wurden. Dies kann nur durch eine relativ hohe Konzentration an MPS in den Zellen vor dem Aufschluss erklärt werden und unterstreicht, wie auch der Zeitverlauf, dass die aus unterschiedlichen Ernten erhaltenen Rohextrakte untereinander verhältnismäßig inhomogen sind. Der Mittelwert der Nullkontrollen wurde von den Temperaturansätzen subtrahiert. Wie Abb.28 zeigt, fand die Bildung von MPS über einen weiten Temperaturbereich von 12,1°C bis 41,5°C statt. Bei Temperaturen $\leq 8^\circ\text{C}$ konnte kein MPS detektiert werden. Das Maximum der Aktivität lag zwischen 29,7°C und 32,7°C, wobei jedoch bereits bei 24,2°C ein deutlicher Aktivitätsanstieg zu beobachten war. Über 33°C fällt die Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase schnell ab, bei 39°C liegt sie noch bei ca. 30% der maximalen Aktivität. Hierbei dürften Denaturierungseffekte aufgrund der Temperatur eine entscheidende Rolle spielen. In der Literatur ist für Stamm HxN1 ein Wachstum auf Hexan in einem Temperaturbereich zwischen 10°C und 35°C mit einem Optimum zwischen 25°C und 28°C (Behrends, 1999) angegeben. Dies deckt sich gut mit den experimentell ermittelten Werten für die Aktivität der Mas.

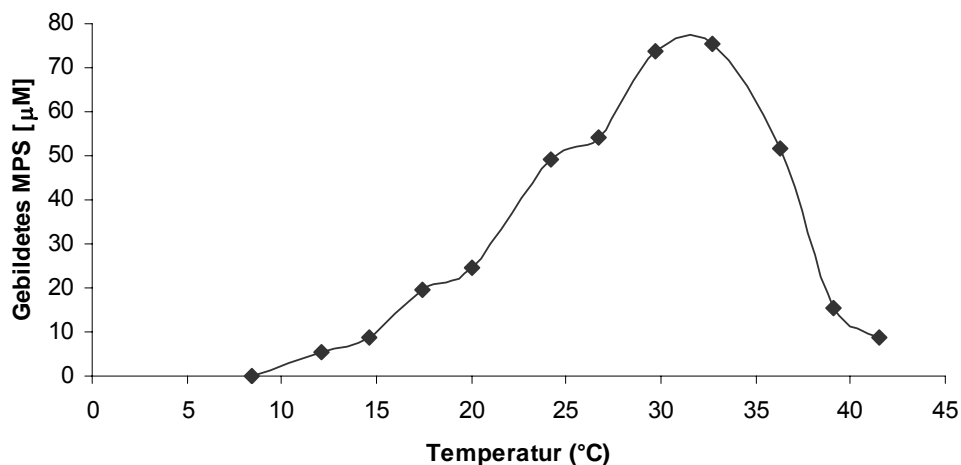


Abbildung 28: Temperaturabhängige Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase
 Die Testansätze enthielten 1 mL Rohextrakt mit 6 % (v/v) Hexan. Die Inkubation erfolgte in temperierten Wasserbädern für 4h. Das ermittelte Temperaturoptimum der Methylalkylsuccinat-Synthase liegt zwischen 30°C und 33°C. (Nullkontrollen abgezogen).

Die Arrhenius-Auftragung (Abb. 29) zeigte über einen breiten Bereich innerhalb der getesteten Temperaturen (12,1°C bis 32,7°C) eine nahezu lineare Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur. Aus der Geradengleichung ergibt sich daraus für die Bildung von Methylpentylsuccinat eine Aktivierungsenergie von ca. 100 kJ/mol.

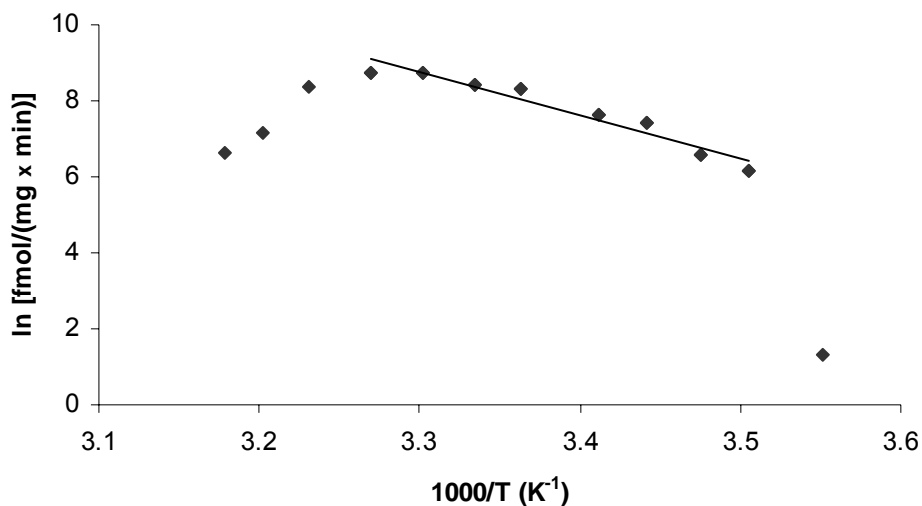


Abbildung 29: Arrhenius-Graph der Temperaturabhängigkeit für die Bildung von Methylpentylsuccinat

6.6. Substratspektrum der Methylalkylsuccinat-Synthase

Zur Bestimmung des Substratspektrums der Methylalkylsuccinat-Synthase wurden unterschiedliche *n*-Alkane (Butan bis Dodecan) sowie Cyclohexan und Toluol als Substrate in den Aktivitätstest eingesetzt. Um mögliche toxische Effekte durch die Substrate auszuschließen wurde deren Konzentration auf 2% (v/v) im Rohextrakt gesenkt. Bei *n*-Butan, als bei Raumtemperatur gasförmigem Substrat, wurden die Ansätze für 1 min mit Butan überspült und mit leichtem Überdruck inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne Substrat. Die Fumarat-Konzentration betrug in allen Ansätzen 40 mM; die Inkubation erfolgte über Nacht bei 28°C im Über-Kopf-Schüttler. Mögliche Additionsprodukte der Substrate an Fumarat wurden über GC-MS-Messungen qualitativ identifiziert. Dabei zeigte sich neben Hexan eine deutliche Aktivierung von Heptan (119% im Vergleich zu Hexan) und Octan (55% im Vergleich zu Hexan). Des Weiteren konnte eine geringe Konzentration Methylbutylsuccinat durch die Aktivierung von Pentan detektiert werden. Allerdings wurden nur 5,4% der Aktivität mit Hexan erreicht. Hexan, Heptan und Octan dienen in Stamm HxN1 auch als Wachstumssubstrate unter anaeroben Bedingungen. Auf Pentan dagegen wurde kein Wachstum beobachtet (Behrends, 1999). Bei keinem weiteren Substrat konnte eine Aktivierung durch die Methylalkylsuccinat-Synthase im Rohextrakt festgestellt werden. Abbildung 30 zeigt den prozentualen Anteil an gebildetem Additionsprodukt verschiedener Substrate im Verhältnis zu Methylpentylsuccinat (MPS, 100%). Eine Negativkontrolle ohne Hexan zeigte kein gebildetes MPS.

Da für kein Substrat außer Hexan ein Standard zur Identifizierung zur Verfügung stand, wurden andere Additionsprodukte über die relative Retentionszeit und die Ähnlichkeit des Fragmentierungsmusters identifiziert. Eine Verlängerung der Alkan-Kette um ein C-Einheit führte zu einer Verschiebung der Retentionszeit um ca. 2,2 min. Für Toluol und Cyclohexan erfolgte ein Vergleich der Daten auch auf Grundlage bekannter Massenspektren (Beller und Spormann, 1997; Florin Musat, MPI Bremen, unveröffentlichte Daten).

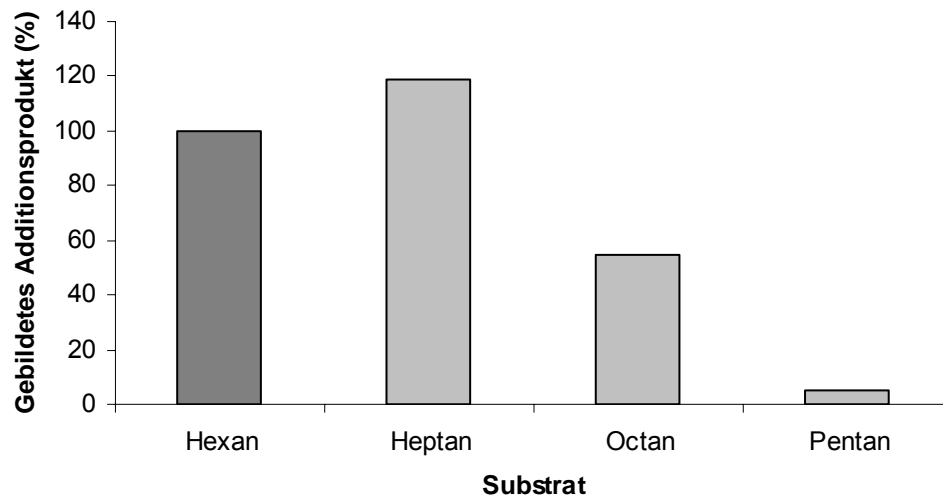


Abbildung 30: Alkanspektrum der Methylalkylsuccinat-Synthase

Die Ansätze wurden mit 2% (v/v) Substrat im Rohextrakt inkubiert, der Ansatz mit Butan wurde überspült und mit leichtem Überdruck inkubiert. Als Vergleichsgrundlage wurde die Konzentration an gebildetem Methylpentylsuccinat ($\mu\text{mol/l}$ im Hexan-Ansatz) als 100 % gesetzt. Butan und die Alkane Nonan bis Dodecan wurden nicht aktiviert.

7. Reinigung der nativen Methylalkylsuccinat-Synthase

Native Methylalkylsuccinat-Synthase wurde aus dem Rohextrakt mit Hexan angezogener HxN1-Zellen über drei Chromatographieschritte isoliert. Alle Reinigungsschritte erfolgten bei 7°C unter anaeroben Bedingungen in einer Anaerobenkammer mit N₂-Atmosphäre. Zur Identifikation der Methylalkylsuccinat-Synthase wurden die Proteinfractionen mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse (anti- α -Untereinheit) untersucht. Zum Zeitpunkt der Entwicklung des Reinigungsprotokolls stand noch kein stabiler Aktivitätstest zur Verfügung, so dass die Methylalkylsuccinat-Synthase-Fractionen nicht über die spezifische Aktivität des Enzyms identifiziert werden konnten. Ein exemplarischer Reinigungsverlauf ist in Abb. 31 abgebildet. Dabei konnten aus 533 mg löslichem Gesamtprotein 7,5 mg gereinigte Methylalkylsuccinat-Synthase erhalten werden.

7.1. Anionenaustauschchromatographie an ANX-Sepharose

Auf die ANX-Säule wurden 3 x 5 ml Zellextrakt mit einer spezifischen Aktivität von $0,0052 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg}_{\text{Protein}})^{-1}$ aufgetragen. Die Elution der Methylalkylsuccinat-Synthase erfolgte mit einem Stufengradienten bei 250 mM NaCl in einem Gesamtvolumen von ca. 70 ml. Für den Aktivitätstest und das Umpuffern über eine Gelfiltrationssäule wurden die Methylalkylsuccinat-Synthase-Fractionen über Ultrafiltrationsmembranen auf ein Volumen von ca. 16 ml eingeengt. In den Tris-gepufferten Ansätzen konnte dabei keine Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase detektiert werden, erst nach dem Umpuffern auf Natriumphosphat-Puffer war Aktivität nachweisbar. Des Weiteren konnte die Aktivität durch Zugabe von BSA erheblich gesteigert werden. Daher wurde nach allen Chromatographieschritten BSA (Endkonzentration ca. 50 mg/ml) in den Aktivitätstest zugesetzt.

7.2. Gelfiltration an Sephadex G 25

Zum Umpuffern in einen 50 mM Natriumphosphat-Puffer wurde das Konzentrat der ANX-Chromatographie auf die Gelfiltrationssäule aufgegeben, die zuvor mit dem Phosphat-Puffer equilibriert wurde. Durch die Säule trat eine ca. 1,5-fache Volumenvergrößerung der Proteinfraction (24 ml) ein. Die Proteinmenge in dieser Fraktion betrug 80 mg. Die spezifische Aktivität lag nach dem Umpuffern bei $0,0039 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg}_{\text{Protein}})^{-1}$.

7.3. Hydroxylapatit-Chromatographie

Die Proteinfraction nach der Gelfiltrationssäule wurde auf eine Hydroxylapatit-Säule aufgetragen und mit einem 250 mM Natriumphosphat-Puffer über einen Stufengradienten eluiert. Die Methylalkylsuccinat-Synthase eluierte bei einer Konzentration von 102 mM Natriumphosphat in einem Volumen von 15 ml. Für den Aktivitätstest wurde das Eluat auf ein Volumen von 5 ml eingengt. Der Proteingehalt lag bei 1,5 mg/ml, die spezifische Aktivität betrug $0,0018 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg}_{\text{Protein}})^{-1}$.

Tabelle 15: Reinigungstabelle der nativen Methylalkylsuccinat-Synthase aus Stamm HxN1

Fraktion	Volumen (ml)	Gesamt- protein (mg)	Aktivität ($\text{nmol} \times \text{min}^{-1}$)	Spezifische Aktivität ($\text{nmol} \times (\text{min} \times \text{mg}_{\text{Protein}})^{-1}$)	Anreicher- ungsfaktor	Aktivitäts- Ausbeute (%)
Rohextrakt	12	533	2,760	0,0052	1	100
ANX (+G25)	24	80	0,310	0,0039	0,75	11,2
Hydroxyl- apatit	5	7,5	0,0138	0,0018	0,35	0,5

Denoch ermöglichte die die Detektion der spezifischen Aktivität nach der Hydroxylapatit-Säule eine zweifelsfreie Identifikation des gereinigten Enzyms als Methylalkylsuccinat-Synthase. Neben der gut im SDS-PAGE Gel zu erkennenden α -Untereinheit konnten auch die beiden kleinen Untereinheiten in dem gereinigten Enzym über spezifische Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abb. 32). Allerdings wies das SDS-PAGE Gel auch nach dem letzten Chromatographieschritt noch ein unbekanntes Protein (ca. 13 kDa) auf. Zur weiteren Überprüfung wurden deshalb die Banden der drei potentiellen Untereinheiten, sowie des unbekanntes Proteins ausgestochen und über einen Peptidmassen-Fingerprint (PMFP) bestimmt. Eine zweifelsfreie Identifizierung der β - und γ -Untereinheit über den PMFP war nicht möglich, da beide Proteine nahezu mit der Lauffront liefen und Verunreinigungen durch andere niedermolekulare Proteine auftraten. Jedoch konnte die Identität der α -Untereinheit zweifelsfrei bestätigt (Protein Score 412; Konfidenzintervall 100%) werden. Die vermeintliche Kontamination wurde als MasB identifiziert (Protein Score 32, Konfidenzintervall 100%), ein Protein welches 34 bp oberhalb von MasC kodiert ist und mit den Genen der anderen drei *mas*-Untereinheiten co-transkribiert wird (Grundmann *et al.*, 2008). Wahrscheinlich bildet MasB eine vierte, bisher noch nicht vorhergesagte Untereinheit der Methylalkylsuccinat-Synthase. Das Auftreten einer Doppelbande in Höhe der α -Untereinheit, die bei Benzylsuccinat-Synthasen durch die oxygenolytische Spaltung an der Radikal-aktivierten Seitenkette entsteht, konnte jedoch nicht beobachtet werden.

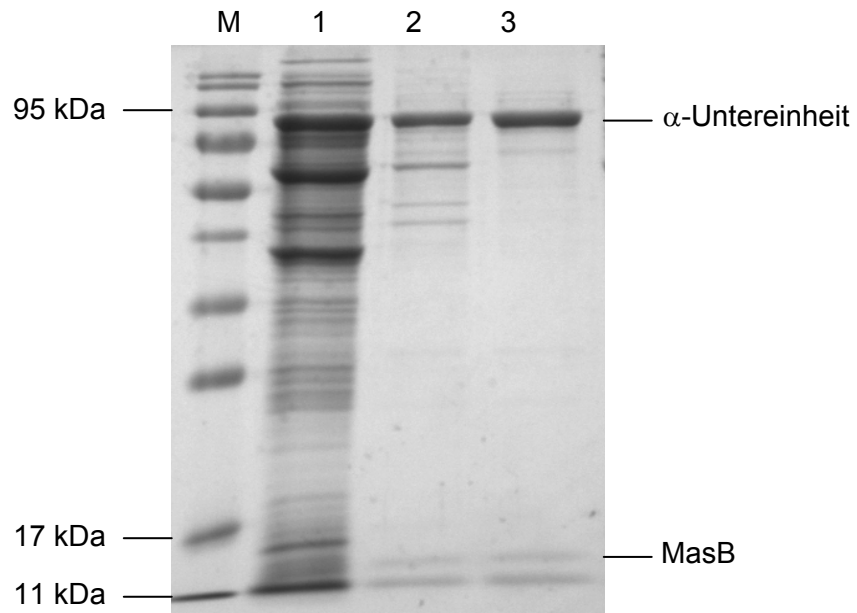


Abbildung 31: 12%ige SDS-PAGE der Reinigungsschritte der Methylalkylsuccinat-Synthase aus Stamm HxN1.

Die Mas-Fractionen der einzelnen Chromatographiestritte wurden aufgetrennt und die Proteine anschließend mit Coomassie R250 angefärbt. M, Proteinstandard; 1, Rohextrakt von mit Hexan angezogenen HxN1-Zellen; 2, ANX-Fraktion; 3, Hydroxylapatit-Fraktion. Die relative Molekülmasse der Standardproteine ist links gezeigt, die einzelnen Untereinheiten der Methylalkylsuccinat-Synthase sind rechts markiert. Beide Proteine wurden über PMFP identifiziert. Die β - und γ -Untereinheit laufen hierbei mit in der Lauffront und konnten nicht aufgetrennt werden.

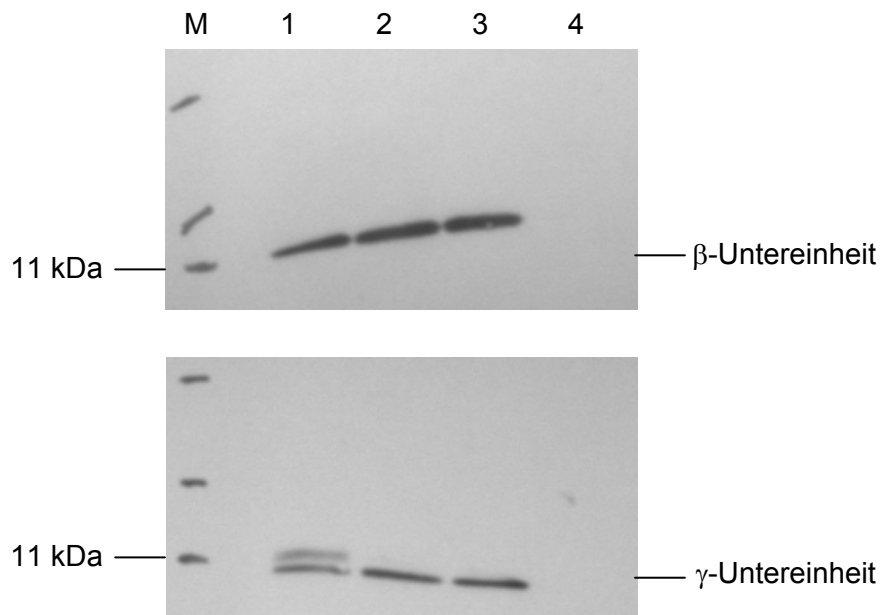


Abbildung 32: Immunoblot zur Identifizierung der β - und γ -Untereinheit in der gereinigten nativen Methylalkylsuccinat-Synthase
M, Proteinstandard; 1, Rohextrakt von mit Hexan gewachsenen HxN1-Zellen; 2, ANX-Fraktion; 3, Hydroxylapatit-Fraktion; 4, Rohextrakt von mit Capronat gewachsenen HxN1-Zellen (Negativkontrolle). Die Proteine wurden auf einem 15% SDS-PAGE Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet. Die Detektion erfolgte über Meerrettich Peroxidase markierten Zweit-Antikörper, die Detektionszeit betrug 1 min. Das Auftreten einer zweiten Bande oberhalb der γ -Untereinheit im Rohextrakt kann bis jetzt noch nicht befriedigend erklärt werden.

7.4. Bestimmung der relativen Molekülmasse der Methylalkylsuccinat-Synthase

Die Methylalkylsuccinat-Synthase eluierte von einer Superdex 200 Gelfiltrationssäule nach einem Volumen von ca. 61 ml. Daraus ergibt sich ein Verteilungskoeffizient (K_{av}) von 0,257 für die Säule. Aus diesen Daten konnte, basierend auf der Kalibrierungsgeraden mit Standardproteinen ($\log MW = -2,1285 \times K_{av} + 2,9031$), eine relative Molekülmasse der Methylalkylsuccinat-Synthase von ca. 237 kDa bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der postulierten $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Komposition für Benzylsuccinat-Synthasen und der neu identifizierten vermutlichen vierten Untereinheit (MasB), wäre für die Methylalkylsuccinat-Synthase eine $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ MasB₂ Komposition (247kDa) denkbar.

E Diskussion

1. Heterologe Expression der Methylalkylsuccinat-Synthase und der Aktivase

Für biochemische Studien (z. B. *in vitro* Aktivierungsexperimente) wurden die Gene der drei Untereinheiten der Methylalkylsuccinat-Synthase (*masCDE*) und die Aktivase (*masE*) aus Stamm HxN1 heterolog in *E. coli* exprimiert. Dies hatte erstens den Vorteil, dass man sehr schnell große Mengen des Enzyms gewinnen und zweitens die Reinigung unter aeroben Bedingungen durchführen konnte, da die Methylalkylsuccinat-Synthase und Aktivase in verschiedenen Stämmen überexprimiert wurden und somit die Mas inaktiv war. Allerdings musste danach noch eine Möglichkeit gefunden werden, sie nach der Reinigung wieder zu reduzieren (mögliche Eisen-Schwefel-Cluster) und dann zu aktivieren, was wahrscheinlich einer längeren Optimierung bedurft hätte, wenn man sich die Probleme bei der Aktivierung der heterolog exprimierten Benzylsuccinat-Synthase (Feil, 2006) anschaut.

1.1. Klonierungsstrategie und Reinigung der Methylalkylsuccinat-Synthase

Für die Methylalkylsuccinat-Synthase wurde der pET-42a-c(+)-Vektor als Expressionsvektor ausgewählt. Dieser Vektor ermöglicht die Fusion des Zielproteins mit einem Gluthation-S-Transferase Tag, über den eine schnelle Reinigung des rekombinanten Proteins mittels Affinitätschromatographie stattfinden kann (Smith und Johnson, 1988). Des Weiteren kann dieser Tag, wenn nötig, über eine Protease-Schnittstelle nachträglich (nach der Reinigung) mit Hilfe von Faktor X_a abgespalten werden. Dies ist von Vorteil, wenn die Funktion des Proteins durch die Fusion mit einer Affinitätssequenz in weiteren Studien möglicherweise beeinflusst ist.

Bei der Methylalkylsuccinat-Synthase wurde nur die α -Untereinheit N-terminal mit dem GST-Tag fusioniert. Um einen Einfluss auf die katalytischen Aktivität auszuschließen, wurde von einer C-terminalen Fusion abgesehen, da sich am C-Terminus der α -Untereinheit das aktive Zentrum des Enzyms befindet. Die erfolgreiche Expression aller drei potentiellen *mas*-Untereinheiten in *E.coli* konnte mithilfe eines Western Blot nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass auch

nach der Affinitätschromatographie nicht nur die große, sondern ebenfalls die zwei kleinen nicht getagten Untereinheiten detektiert werden konnten (siehe Abb. 32), gehe ich davon aus, dass es in *Escherichia coli* zu einer nativen Faltung der drei Untereinheiten und zur Bildung des Holoenzym kommt. Allerdings konnte nur eine geringe Ausbeute an löslichem Protein erzielt werden (0,48 µg/ml Kultur). Der weitaus größere Anteil des Proteins befand sich nach dem Aufschluss in der Zelltrümmer-Fraktion. Wahrscheinlich wird der Großteil des rekombinanten Proteins in Einschlusskörpern (inclusion bodies) gelagert. Es wurden keine Versuche zum Lösen der inclusion bodies unternommen, da befürchtet wurde, dass durch den Löseprozess (z. B. mit Harnstoff) keine korrekte Faltung der drei Untereinheiten mehr möglich ist. Es wurde deshalb vorgezogen die Kulturgrößen von *E. coli* anzupassen, da dies wesentlich einfacher erschien.

1.2. Klonierungsstrategie und Reinigung der Aktivase

Für die Expression der Aktivase wurde der pT7-SBP-2-Vektor als Expressionsvektor verwendet. Der Vektor ist mit einem SBP-Tag ausgestattet, einer Weiterentwicklung des Strep-Tag. Dieser wurde erstmals 1993 für die Affinitätsreinigung von Proteinen (Schmidt und Skerra, 1993) eingesetzt und kontinuierlich weiterentwickelt (Strep Tag II, Schmitdt *et al.*, 1996; SBP-Tag, Kefee *et al.* 2001). Wie beim Strep-Tag erfolgt die Reinigung beim SBP-Tag über eine Streptavidin-haltige Matrix. Der SBP-Tag wurde ausgewählt, da reduzierende Agenzien im Puffer die Funktionalität des Systems nicht beeinflussen und somit eine Elution des Proteins auch unter anoxischen Bedingungen möglich ist. Dies wäre von Vorteil, wenn eine Reaktivierung von aerob produziertem Protein nicht möglich ist. Des Weiteren eignen sich Streptavidin-bindende Tags gut für Metall-enthaltende Enzyme (Terpe, 2003), so dass eine mögliche Beeinträchtigung der drei Eisen-Schwefel Cluster der Aktivase minimiert wird.

Eine erfolgreiche Expression der fusionierten Aktivase in *E.coli* konnte in SDS-PAGE Gelen nachgewiesen werden. Allerdings war die Ausbeute an isoliertem Protein, wie bei der Mas, sehr gering und das Protein konnte nicht vollständig aufgereinigt werden (eine Kontaminante; siehe Abb. 13) Für weitere proteinbiochemische Untersuchungen, wie z. B. der *in vitro* Aktivierung der Mas, ist es

allerdings nötig, dass Enzym in größeren Mengen zu produzieren. Daher muss die Reinigung der heterolog exprimierten Aktivase noch optimiert werden.

In vitro Aktivierungsstudien, mit der heterolog exprimierten Methylalkylsuccinat-Synthase und der Aktivase wurden noch nicht durchgeführt. Ausschlaggebend für diese Entscheidung war, dass im Laufe dieser Arbeit für die Methylalkylsuccinat-Synthase eine weitere potentielle Untereinheit entdeckt wurde. Diese Untereinheit ist nicht in dem genetischen Überexpressionskonstrukt enthalten. Daher ist eine erfolgreiche *in vitro* Aktivierung mit dem bestehenden Konstrukt eher unwahrscheinlich. Neben den Aktivierungsstudien der Mas bietet aber auch die Aktivase selbst interessante Studienansätze. Aufschlussreich wären sicherlich EPR-Studien, um die genetisch postulierten Eisen-Schwefel Zentren des Enzyms näher zu charakterisieren.

2. Identifikation potentieller Methylalkylsuccinat-Synthase (*mas*)-Gene

Die Aktivierung von Toluol und anderer Methyl-substituierter Aromaten wird unter anaeroben Bedingungen durch die Addition der Methylgruppe an die Doppelbindung von Fumarat eingeleitet. Diese Reaktion wurde für unterschiedliche Elektronenakzeptoren beschrieben und die genetische Organisation der beteiligten Enzyme näher untersucht (Leuthner *et al.*, 1998; Coschigano *et al.*, 1998; Kane *et al.*, 2002; Kube *et al.*, 2004; Shinoda *et al.*, 2005). Ein analoger Aktivierungsmechanismus wurde bei der anaeroben Aktivierung von Hexan in dem denitrifizierenden Stamm HxN1 nachgewiesen (Grundmann *et al.*, 2008). Die identifizierten *mas*-Gene (nach dem entstehenden Reaktionsprodukt Methylalkylsuccinat) besitzen dabei Ähnlichkeiten zu den entsprechenden Genen der Toluolabbauer. Ein alternativer anaerober Abbauweg für Alkane über Carboxylierung wurde bisher nur auf Grundlage von Metabolitstudien postuliert, aber weder genetisch noch proteinbiochemisch belegt (So *et al.*, 2003, Callaghan *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit sollte die Verbreitung des Fumarat-Additionsmechanismus und die genetische Diversität der Gene an Hand bereits isolierter Alkanabbauer untersucht werden. Dabei konnten in drei weiteren Stämmen *mas*-Gene identifiziert werden.

In Stamm OcN1, einem weiteren denitrifizierendem Bakterium, konnte eine ähnliche genetische Organisation der *mas*-Gene wie in Stamm HxN1 nachgewiesen werden. Ebenso wie Stamm HxN1 nutzt Stamm OcN1 kurzkettige *n*-Alkane beim Wachstum unter anaeroben Bedingungen.

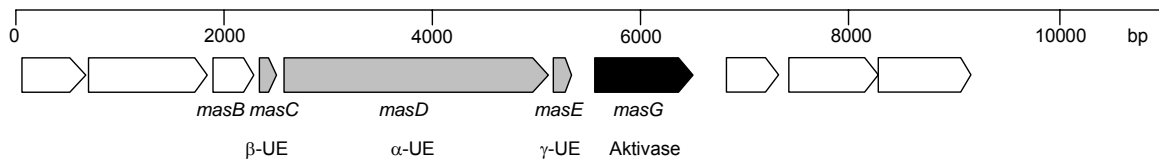


Abbildung 33: Genetische Organisation des Ocn1 Operons
(*mas*, Methylalkylsuccinat-Synthase-Gen; UE, Untereinheit des Proteins)

Neben den drei potentiellen Untereinheiten der Methylalkylsuccinat-Synthase (*masC*, β-Untereinheit; *masD*, α-Untereinheit und *masE*, γ-Untereinheit) konnte auch das Gen einer möglichen Aktivase (*masG*) entdeckt werden. Dieses ist, analog zu Stamm HxN1, direkt unterhalb zur β-Untereinheit kodiert. Im Gegensatz dazu liegen alle bekannten Aktivasen von Toluolabbauern oberhalb der homologen Benzylsuccinat-Synthase (*bss*)-Gene. Auch bei dem unter sulfatreduzierenden Bedingungen Hexadecan abbauenden Stamm *Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01 (Callaghan *et al.*, 2008) ist die Aktivase oberhalb der Alkylsuccinat-Synthase (*ass*)-Gene lokalisiert. Für diesen Stamm wurden außerdem erstmals zwei *ass*-Operons im Genom beschrieben, wobei bisher nur die Expression einer der beiden großen Ass-Untereinheiten bestätigt werden konnte. Vermutlich ist nur das *ass1*-Operon funktional. In dem zu AK-01 eng verwandten Stamm *Desulfatibacillum* sp. Pnd3 konnte ebenfalls ein *masC*-, *masD*- und *masE*-Gen (d. h. alle drei potentiellen Untereinheiten der Methylalkylsuccinat-Synthase) nachgewiesen werden. Ferner deuteten Metabolitstudien in einem weiteren sulfatreduzierenden Bakterium, dem thermophilen Stamm TD3, auf einen Fumarat-Additionsmechanismus hin. Dabei wurden während des Wachstums auf *n*-Decan succinylierte Additionsprodukte identifiziert (persönliche Mitteilung R. Rabus). Auch in diesen Stamm konnten weite Teile des *masD*-Gens (ca. 2400 bp) gefunden werden. Interessant ist die Identifikation von *masB* in Stamm Ocn1. Dieses Gen codiert ein hypothetisches Protein und wurde erstmals im *mas*-Operon von Stamm HxN1 gefunden. Dort wird es zusammen mit den *mas*-Genen und dem Gen der Aktivase co-transkribiert. In der Diplomarbeit von K.Webner konnte dieses auch für das *masB*-Gen aus Ocn1 gezeigt werden. Obwohl in der Genomannotation von Stamm AK-01 ein homologes Gen bisher unbekannt war, konnte es durch Sequenzvergleich in den veröffentlichten Genomdaten identifiziert werden. Untersuchungen in weiteren Alkanabbauern, wie Stamm Pnd3, zeigen ebenfalls ein *masB*-Homolog. Dem entgegen konnte das *masB*-Gen bisher in keinem Toluol-abbauenden Organismus gefunden werden. Das Vorkommen dieses

Proteins scheint auf Alkan-verwertende Organismen beschränkt zu sein, was auf eine spezifische Funktion im anaeroben Alkanabbau hindeutet.

Studien zur Quantifizierung (quantitative PCR) von anaerob Kohlenwasserstoff-abbauenden Bakterien in Öl-kontaminierten Wasserschichten (Winderl *et al.*, 2007; Winderl *et al.*, 2008) nutzen das *bssA*-Gen als funktionellen Marker. Durch die Ähnlichkeit der *bss*- und *mas*-Gene ist eine Abgrenzung von Alkan- und Aromaten-Abbauern nur schwer möglich. Das *masB*-Gen bietet gegebenenfalls eine Möglichkeit zur genaueren Unterscheidung.

3. Methylalkylsuccinat-Synthasen als Glycinradikalenzyme (GRE)

Enzymatisch werden Methylalkylsuccinat-Synthasen (Mas) in die Familie der GRE eingeordnet. Die Familie der GRE wächst stetig, 2007 zeigten mehr als 600 Proteine in den Datenbanken das für diese Familie charakteristische IVRXXGXS-Motiv (Marquet *et al.*, 2007). Dieses umfasst das konservierte aktive Zentrum der Enzyme mit einem Glycin am C-Terminus der Polypeptidkette. Das Motiv konnte in den drei untersuchten Stämmen (OcN1, Pnd3 und TD3) in der katalytisch aktiven α -Untereinheit nachgewiesen werden. Weiterhin typisch für GRE ist ein konserviertes Cystein, welches während der Reaktion durch Elektronenübertragung ein transientes Thiyl-Radikal bildet (Selmer *et al.*, 2005). Auch das konservierte Cystein konnte in allen Sequenzen identifiziert werden. Damit gehören die anaerob Alkan-aktivierenden Enzyme der Stämme OcN1, Pnd3 und AK-01 zweifelsfrei zu der Familie der GRE. Bis Ende 2007 waren fünf verschiedene Subgruppen bekannt (1) Pyruvat-Formiat Lyasen (Knappe *et al.*, 1984), (2) anaerobe Ribonukleotid-Reduktasen (Eliasson *et al.*, 1990), (3) (*R*)-Benzylsuccinat-Synthasen (Leuthner *et al.*, 1998), (4) *p*-Hydroxy-Phenylacetat-Decarboxylase (Selmer und Andrei 2001) und (5) CoenzymB12-unabhängige Glycerin-Dehydratase (Raynaud *et al.*, 2003). In Grundmann *et al.* (2008) wurde jedoch postuliert, dass Methylalkylsuccinat-Synthasen eine neue Gruppe von GRE bilden. Dies konnte durch die neu generierten Sequenzen bestätigt werden. Die Sequenzidentität zu Stamm HxN1 und untereinander liegt auf Proteinebene bei ca. 76%. Die geringen Homologien zur Gruppe der Benzylsuccinat-Synthasen (Sequenzidentität auf Proteinebene zur nächst verwandten Benzylsuccinat-Synthase ca. 30%) lassen eine spezifische Adaption des Enzyms an die Gegebenheiten des anaeroben Alkanabbaus vermuten.

Methylalkylsuccinat-Synthasen besitzen neben der katalytisch wirksamen großen Untereinheit mindestens zwei weitere kleine Untereinheiten. Ein Aufbau aus mehreren Untereinheiten ist bei GREs ansonsten nur noch bei Benzylsuccinat-Synthasen (zwei kleine Untereinheiten) und bei der *p*-Hydroxy-Phenylacetat-Decarboxylase bekannt, die eine zusätzliche Untereinheit aufweist. Alle anderen GRE Gruppen enthalten keine weiteren Untereinheiten. Die γ -Untereinheiten der Methylalkylsuccinat-Synthasen sind untereinander diverser als die α -Untereinheiten und weisen nur eine geringe Sequenzidentität zu den entsprechenden Benzylsuccinat-Synthase-Proteinen auf. Auffallend für γ -Untereinheiten ist jedoch ein hoher Cystein-Anteil im Molekül (OcN1 5/62 Aminosäuren, Pnd3 4/55 Aminosäuren; HxN1 5/61 Aminosäuren; AK01 4/54 Aminosäuren). Diese konservierten Cysteine bilden im N-Terminus ein CXXC-Motiv und sind möglicherweise an der Bindung eines Eisen-Schwefel Clusters beteiligt (Leuthner *et al.*, 1998).

Zur Einführung des Radikals in die Peptidkette benötigen alle GRE ein weiteres Enzym, eine sogenannte Aktivase. Die Aktivasen gehören zur Familie der S-Adenosymethionin (SAM)-Radikalenzyme. Das Hauptcharakteristikum aller GRE-Aktivasen ist das CXXXCXXC-Motiv in der Peptidkette (Sofia *et al.*, 2001; Frey *et al.*, 2008). Dieses koordiniert ein spezielles $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster. Im N-Terminus der potentiellen Aktivase von Stamm OcN1 konnte dieses Motiv ebenfalls identifiziert werden (siehe Abb.19), so dass für diesen Stamm ebenfalls ein Aktivierungsmechanismus über die reduktive Spaltung von SAM angenommen werden kann. Daneben enthält die Aktivase zwei zusätzliche Motive für $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster ($\text{C}^{57}\text{MQCGTCARVC}$ und $\text{C}^{96}\text{SYCMECVKAC}$), welche typische Ferredoxin-Motive repräsentieren. Ähnliche Sequenzen wurden auch in den Aktivasen von Stamm HxN1 und anderen GRE-Aktivasen (Yu *et al.*, 2006; Selmer *et al.*, 2005) gefunden, nicht aber in den Aktivasen der Pyruvat-Formiat Lyasen. Die genaue Rolle der zusätzlichen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster ist noch nicht bekannt.

4. Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase von Stamm HxN1 im Rohextrakt

Die bisherige Charakterisierung der Methylalkylsuccinat-Synthase (Mas) aus Stamm HxN1 umfasst den genetischen Hintergrund des Enzyms sowie die Identifikation der Gene auf Proteinebene. Transkriptionsstudien der Gene für die Methylalkylsuccinat-Synthase zeigten ein polycistronisches Ablesen des Operons. Die Expression der vermutlichen α - und γ -Untereinheit konnte zusätzlich in 2D-Gelelektrophorese-Studien nachgewiesen werden (Grundmann *et al.*, 2008). Zur weiteren Beschreibung des Enzyms ist nun die Bestimmung der *in vitro* Aktivität von großer Wichtigkeit. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmal die Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase im Rohextrakt bestimmt werden. Je nach Extrakt lag die Aktivität bei $0,004-0,027 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg}_{\text{Protein}})^{-1}$. Dieser Wert ist viel zu niedrig, um das Wachstum von Stamm HxN1 auf Hexan erklären zu können. Unter Berücksichtigung des Nitratverbrauchs der Kulturen müsste der Wert um den Faktor 200-1000 höher liegen. Ein ähnliches Phänomen beobachtet man ebenfalls bei den Benzylsuccinat-Synthasen, wenn auch weniger ausgeprägt. Für die Benzylsuccinat-Synthase aus *Thauera aromatica* wurde im Rohextrakt eine Aktivität von $0,02-0,2 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg}_{\text{Protein}})^{-1}$ detektiert (Leuthner *et al.*, 1998). Versuche mit wachsenden Zellen ergaben eine Aktivität von $12 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg}_{\text{Protein}})^{-1}$ (Biegert und Fuchs, 1995). Bei *Azorcus* sp. Stamm T lag die Aktivität im Rohextrakt bei $5,9 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg}_{\text{Protein}})^{-1}$ (Beller und Spormann, 1999). Verglichen mit der *in vivo* Aktivität liegt die gemessene Aktivität von *Azoarcus* sp. Stamm T damit bei 35-40%.

Mögliche Ursachen für die geringe *in vitro* Aktivität in Stamm HxN1 könnten darin liegen, dass (1) das Enzym nur in bestimmten Wachstumsphasen gebildet wird und somit zum Erntezeitpunkt nicht in ausreichender Menge vorhanden ist, (2) die Methylalkylsuccinat-Synthase zu spezifischen Zeitpunkten in der Zelle aktiviert wird (Aktivierung/Deaktivierung des Enzyms) oder (3) das Protein während der Ernte und weiteren Aufarbeitung inaktiviert wird.

Zu (1): Eine verstärkte Expression des Enzyms zu bestimmten Wachstumsphasen der Kultur konnte nicht beobachtet werden. Über den Versuchsverlauf mit steigender OD_{600} der Kultur und unterschiedlichen Nitratkonzentrationen war der Mas-Anteil in der Zelle annähernd konstant. Daher ist eine Wachstumsphasen-bedingte Expression des Enzyms eher unwahrscheinlich.

Zu (2): Um Aussagen über den Aktivierungszustand des Enzyms zu ermöglichen wurde der Proteinextrakt mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analysen untersucht. Für alle bisher bekannten GRE wird eine dimere Zusammensetzung postuliert, wobei nur eine der beiden großen Untereinheiten aktiviert wird und das Radikal trägt. Gestützt wird diese Hypothese durch das Auftreten einer zweiten, verkürzten α -Untereinheit in der Benzylsuccinat-Synthase von *Thauera aromatica*. Diese Untereinheit unterscheidet sich nur im C-Terminus von der aktivierten α -Untereinheit. Ihr Zustandekommen wird durch die oxygenolytische Spaltung der Polypeptidkette am Radikal erklärt (Leuthner *et al.* 1998). Für Stamm HxN1 konnte bisher jedoch keine verkürzte α -Untereinheit nachgewiesen werden. Es trat immer nur eine Bande entsprechender Größe auf. Entweder ließen sich also die beiden Untereinheiten unter den gegebenen Analysebedingungen nicht auftrennen oder bei der Methylalkylsuccinat-Synthase werden beide Untereinheiten aktiviert und dementsprechend oxygenolytisch gespalten. Dem widersprachen die Western-Blots mit einem Peptidantikörper gegen das mögliche Abspaltungsprodukt. Diese ergaben ein positives Signal auf Höhe der α -Untereinheit, so dass mindestens eine Kette ungespalten vorliegen muss. Eventuell liegt daher nur ein sehr geringer Teil des Enzyms in den Zellen aktiviert vor (Konzentration des Spaltproduktes zu niedrig für Coomassie-Färbung). Diese Vermutung korrespondiert mit den geringen *in vitro* Aktivitäten, die für die Methylalkylsuccinat-Synthase gemessen wurden. Eine reversible Deaktivierung des Radikals, wie sie für die Pyruvat-Formiat Lyase (Pfl) beschrieben wurde (Kessler *et al.*, 1992), konnte bisher allerdings in keinem weiteren GRE nachgewiesen werden. Demnach wird das Glycinradikal der Pyruvat-Formiat Lyase durch ein weiteres Enzym (AdhE) gequenscht und so vor einer irreversiblen Inaktivierung durch Sauerstoff geschützt. Neuere Ergebnisse bestätigten die Rolle von AdhE jedoch nicht (Nnyepi *et al.*, 2007), sondern deuteten auf einen Einfluss der verwendeten Reduktionsmittel auf die Aktivität. Kleine Moleküle wie Dithiothreitol führten zu einer stärkeren Deaktivierung der Pfl, bei größeren Molekülen konnte keine Deaktivierung beobachtet werden. Eventuell könnte sich in Stamm HxN1 die hohe Konzentration an Reduktionsmitteln im Aktivitätstest zusammen mit der langen Inkubationszeit negativ auf die Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase auswirken. Demgegenüber steht aber der geringe Einfluss variierender Reduktionsmittelkonzentrationen auf die Enzymaktivität.

Weiterhin bleibt fraglich, inwieweit die Methylalkylsuccinat-Synthase im Rohextrakt erneut über die Aktivase aktiviert werden kann, bzw. inwieweit die Aktivase

nach dem Aufschluss überhaupt noch funktional ist. Erkenntnisse darüber könnte die Zugabe von S-Adenosyl-Methionin (SAM) zum Rohextrakt geben, welches als Co-Substrat bei der Aktivierung dient. Bisher gibt es jedoch keinen eindeutigen Hinweis, die auf eine reversible Deaktivierung der Methylalkylsuccinat-Synthase in der Zelle schließen lassen.

Zu (3): Von großer Bedeutung für die *in vitro* Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase ist der Erntezeitpunkt der Kultur. Wie die Versuche gezeigt haben, muss die Ernte der Zellen zu einem Zeitpunkt stattfinden, an dem die Zugabe von Nitrat eingestellt und im Medium kein Nitrat und Nitrit mehr zu detektieren ist. D. h. eine Ernte in der exponentiellen Wachstumsphase der Kultur, in der eine hohe Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase zu vermuten ist, ist nicht möglich. Proteinextrakte von zu diesem Zeitpunkt geernteten Kulturen zeigten keine Aktivität. Dies legt die Vermutung nahe, dass Nitrat oder Produkte der Denitrifikation (Nitrit, Stickstoffmonoxid, Distickstoffmonoxid) sich negativ auf die Methylalkylsuccinat-Synthase auswirken. Möglicherweise wird das Radikal in der Seitenkette durch Nitrit, NO oder N₂O geschädigt. Ein bekannter, regulatorischer Effekt ist z. B. die S-Nitrosylierung von Proteinen durch NO (Ding und Demple, 2000; Broillet, 1999). Ein toxischer Effekt durch diese Substanzen lag während des Wachstums allerdings nicht vor, da die Verdopplungszeit der Kultur 9 h betrug. Frühere Veröffentlichungen ergaben für Stamm HxN1 eine Verdopplungszeit von 11 h beim Wachstum auf Hexan (Ehrenreich *et al.*, 2000). Eine vermutete Schädigung des Enzyms würde demnach erst durch den direkten Kontakt während des Aufschlusses erfolgen. Versuche mit Zusatz von NO zu den Testansätzen zeigten jedoch eine nicht so starke Auswirkung auf die Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase wie erwartet. Über die Betrachtung möglicher toxischer Effekte hinaus muss berücksichtigt werden, dass der Reaktionsmechanismus ein Radikal involviert. Dieses Radikal ist möglicherweise im Rohextrakt weniger stabil als in der Zelle und reagiert sich an anderen Zellbestandteilen ab. So liegt der lineare Reaktionsbereich der Benzylsuccinat-Synthase aus *T. aromatica* bei 20 min (Leuthner *et al.*, 1998). Für die Methylalkylsuccinat-Synthase ist dieser lineare Bereich allerdings bis zu 8 h (siehe Abb. 27). Dies deutet auf eine sehr viel höhere Stabilität des Enzyms im Rohextrakt hin als bisher angenommen, was wiederum nahe legt, dass das Enzym eher während der Isolierung inaktiviert wird.

5. Reinigung der nativen Methylalkylsuccinat-Synthase

Für einen eindeutigen Funktionsnachweis von Enzymen muss das entsprechende Protein aufgereinigt und die postulierte Reaktion *in vitro* bestätigt werden. Auch ermöglicht die Reinigung eines Enzyms eine Aussage über die potentielle Zusammensetzung (Quartärstruktur). In dieser Arbeit gelang es, die Bildung eines Alkylsuccinats durch die gereinigte Methylalkylsuccinat-Synthase nachzuweisen und somit die vorhergesagte katalytische Funktion des Enzyms zu bestätigen.

5.1. Aktivität der gereinigten Methylalkylsuccinat-Synthase

Die Methylalkylsuccinat-Synthase wurde über drei Chromatographieschritte aus dem Rohextrakt Hexan-gewachsener Zellen aufgereinigt. Dabei war in den einzelnen Chromatographieschritten ein hoher Aktivitätsverlust zu beobachten. Die Gesamtaktivitätsausbeute betrug nur 0,5% (siehe Tab. 16). Daneben sank untypischerweise die spezifische Aktivität des Enzyms im Reinigungsverlauf. Mögliche Ursachen hierfür liegen in (1) einer denkbaren Interaktion der Methylalkylsuccinat-Synthase mit den Chromatographiematerialien und einer damit einhergehenden Inaktivierung des Enzyms oder in (2) einem gegenüber dem Rohextrakt stark veränderten Puffersystem (inklusive Zusatzstoffen).

Tabelle 16: Spezifische Aktivität und Ausbeute der Methylalkylsuccinat Synthase in den Reinigungsfractionen

Der zweite Chromatographieschritt über eine Gelfiltrationssäule brachte keinen Reinigungseffekt, war jedoch zum Umpuffern und zur Aktivitätserhaltung notwendig.

Fraktion	Spezifische Aktivität [nmol × (min × mg _{Protein}) ⁻¹]	Aktivitäts-Ausbeute [%]
Rohextrakt	0,0052	100
ANX (+G25 Gelfiltration)	0,0039	11,2
Hydroxylapatit	0,0018	0,5

Zu (1): Von der Benzylsuccinat-Synthase aus *Thauera aromatica* ist bekannt, dass diese während der Reinigung stark inaktiviert wird. Besonders starke Anionentauscher beeinträchtigen die Aktivität des Enzyms (Leuthner *et al.* 1998). Nach dieser Säule betrug die Aktivität nur noch 1% der Ausgangsaktivität. Aus diesem Grund wurde in dem Reinigungskonzept von Beginn an versucht, auf dieses Material zu verzichten. Nicht auszuschließen ist aber, dass die ANX-Sepharose (schwacher Anionentauscher mit einer funktionellen Diethylaminopropyl-Gruppe) eine ähnliche Auswirkung auf die Methylalkylsuccinat-Synthase hat. Der ebenfalls schwache Anionentauscher DEAE-Sepharose zeigte allerdings keinen gravierenden Effekt auf die Aktivität der Benzylsuccinat-Synthase (90% Aktivitäts-Ausbeute) in *T. aromatica*. Auch bei der Hydroxylapatit-Chromatographie sank die Aktivität zwar spürbar (40% Ausbeute), aber nicht so stark wie hier für die Methylalkylsuccinat Synthase beobachtet. Auch in der Reinigung der Benzylsuccinat-Synthase aus *Azoarcus* sp. Stamm T traten starke Aktivitätsverluste während der Reinigung auf. Die Gesamtausbeute lag bei nur 0,7% der ursprünglichen Aktivität (Beller und Spormann, 1999). Vergleichend mit den Reinigungsergebnissen beider Benzylsuccinat-Synthasen liegen die Werte für Stamm HxN1 auf einem ähnlichem Niveau. Bei allen aufgereinigten Enzymen trat ein fast 99% -iger Aktivitätsverlust auf, was die enorme Reaktivität dieser Enzyme demonstriert.

Zu (2): Proteine können an Aktivität verlieren, wenn sie sich außerhalb ihrer natürlichen Zellumgebung befinden. Intrazellulär herrschen oft andere Bedingungen (z. B. Ionenstärke, Proteinkonzentration, Co-Substrate), so dass es zu Aktivitätsverlusten durch Proteolyse, Agglomeration oder die falschen Pufferbedingungen kommen kann. Auch bei der Methylalkylsuccinat-Synthase beeinflussen die Pufferbedingungen die Aktivität des Enzyms. Der Tris-gepufferte Ansatz nach dem ersten Chromatographieschritt zeigte auch nach Aufkonzentrierung keine Aktivität. Erst in einem Phosphat-gepufferten System war diese wieder nachweisbar. Des Weiteren schien die Proteinkonzentration im Ansatz von Bedeutung zu sein. Durch Zugabe von Rinderserumalbumin als „Füllprotein“ wurde eine künstlich hohe Proteinkonzentration erzeugt, die zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung in den Reinigungsfraktionen führte. Allerdings liegen die gemessenen Aktivitäten nach wie vor weit unter den theoretisch zu erwartenden Werten. Eventuell fehlen also noch weitere Faktoren, um die Aktivität der Methylalkylsuccinat-Synthase aufrecht zu erhalten. Es könnte sich dabei z. B. um Ionen handeln, die während der Chromatographie abgetrennt

werden. Weiterführende Versuche dazu wären z. B. der Zusatz von inaktivem oder proteinfreiem Rohextrakt, um die Enzymaktivität wieder herzustellen.

5.2. Zusammensetzung der Methylalkylsuccinat-Synthase

Für die Methylalkylsuccinat-Synthase wurde aufgrund ihrer genetischen und funktionellen Ähnlichkeit zu Benzylsuccinat-Synthasen eine $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -Zusammensetzung auf Proteinebene postuliert. In dem aufgereinigten Enzym konnten eben diese drei Untereinheiten zweifelsfrei über Western-Blot Analysen (β - und γ -Untereinheit) und Peptidmassenfingerprint (α -Untereinheit) identifiziert werden. Zusätzlich wurde jedoch auch das potentielle Genprodukt von *masB*, einem Gen direkt oberhalb der γ -Untereinheit gelegen, nachgewiesen. Dieses Protein konnte auch durch eine zusätzliche Gelfiltration an Superdex 200 nicht abgetrennt werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass MasB eine vierte, bisher unbekannte Untereinheit (δ -Untereinheit) der Methylalkylsuccinat Synthasen darstellt. Diese These wird unterstützt durch die Tatsache, das *masB* polycistronisch mit den anderen Genen der Methylalkylsuccinat-Synthase transkribiert wird und auch bei allen bisher untersuchten Alkanabbauern identifiziert werden konnte. Damit sind die Methylalkylsuccinat Synthasen die einzigen bekannten Glycinradikalenzyme mit drei weiteren Untereinheiten neben der Radikaltragenden α -Untereinheit. Dies unterstreicht die Einordnung der Methylalkylsuccinat-Synthasen in eine neue Gruppe von Glycinradikalenzymen. Die Funktionen der kleinen Untereinheiten sind zur Zeit jedoch noch unbekannt. In der Dissertation von C. Feil (2006) wird spekuliert, dass diese ein weiteres "aktives Zentrum" der Benzylsuccinat-Synthasen bilden und an der Reaktion des Benzylsuccinylradikals mit Fumarat beteiligt sind (ping-pong Mechanismus). Vergleicht man die bekannten Proteinsequenzen der kleinen Untereinheiten, so sind die γ -Untereinheiten stärker konserviert als die β -Untereinheiten. Möglicherweise ist die β -Untereinheit daher wichtig für die Substratspezifität des Enzyms. Erste Arbeiten an einem genetischen System für Stamm HxN1, das den gezielten Austausch von Genen ermöglichen würde, laufen bereits (Webner, 2008). Die Etablierung des genetischen Systems wird das Verständnis für den Mechanismus der Methylalkylsuccinat-Synthase deutlich verbessern, denn es ermöglicht z. B. den gezielten Austausch der kleinen Untereinheiten oder gezielte Punktmutationen in der Peptidkette.

Die erfolgreiche Reinigung der Methylalkylsuccinat-Synthase ermöglicht nun die Kristallisation des Enzyms, was zur genauen Strukturaufklärung führen könnte. Dies wäre sehr interessant, da bisher nur von Glycinradikalenzymen bestehend aus einer Polypeptidkette Kristallstrukturen vorliegen. Es ist bislang keine Kristallstruktur von einem Glycinradikalenzym mit mehreren Untereinheiten bekannt. Kristallisiert und näher analysiert wurden bisher eine Pyruvat-Formiat Lyase aus *E.coli* (Becker *et al.*, 1999), eine Glycerol Dehydratase aus *Clostridium butyricum* (O'Brien *et al.*, 2004) und eine anaerobe Ribonukleotid Reduktase des T4 Bakteriophagen (Logan *et al.*, 1999). Daneben wurde die Struktur eines weiteren Pyruvat-Formiat ähnlichen Enzyms mit bisher unbekannter Funktion (PFL2) aus *Archaeoglobus fulgidus* beschrieben (Lehtiö *et al.*, 2006). Allerdings ist die Bedeutung der kleinen Untereinheiten in den Glycinradikalenzymen noch nicht eindeutig geklärt. Für die aus zwei Untereinheiten bestehende Hydroxyphenylacetat Decarboxylase aus *Clostridium difficile* konnte bereits gezeigt werden, dass die kleine Untereinheit essentiell für die Aktivität des Enzyms ist (Andrei, 2004). Um die genaue Rolle der Untereinheiten klären zu können ist allerdings eine Strukturaufklärung unerlässlich.

Die oben genannten Proteine wurden zur Strukturaufklärung heterolog exprimiert, gereinigt und kristallisiert. Jedoch wurde dabei für alle Enzyme die Kristallstruktur der nicht-aktiven Form (ohne Radikal) ermittelt. Die Struktur eines nativ gereinigten, aktiven Glycinradikalenzym konnte bisher nicht aufgeklärt werden, könnte aber weitere wichtige Erkenntnis über die Bindungen im aktiven Zentrum vermitteln. Die in dieser Arbeit aufgereinigte native Methylalkylsuccinat-Synthase kann nun die Grundlage für diese Kristallisationsexperimente bilden.

F Literaturverzeichnis

- Achong GR, Rodriguez AM und Spormann AM** (2001). Benzylsuccinate synthase of *Azoarcus* sp. strain T: cloning, sequencing, transcriptional organization, and its role in anaerobic toluene and *m*-xylene mineralization. *J. Bacteriol.* 183: 6763–6770
- Aeckersberg F, Bak F und Widdel F** (1991). Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* 156: 5–14
- Aeckersberg F, Rainey FA und Widdel F** (1998) Growth, natural relationships, cell fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria utilizing long-chain alkanes under anoxic conditions. *Arch. Microbiol.* 170: 361–369
- Andrei PI, Pierik AJ, Zauner S, Andrei-Selmer LC und Selmer T** (2004). Subunit composition of the glycyl radical enzyme *p*-hydroxyphenylacetate decarboxylase. a small subunit, HpdC, is essential for catalytic activity. *Eur. J. Biochem.* 271: 2225–2230
- Baptist JN, Gholson RK und Coon MJ** (1963) Hydrocarbon oxidation by a bacterial enzyme system. I. Products of octane oxidation. *Biochem. Biophys. Acta* 69: 40–47
- Becker A, Fritz-Wolf K, Kabsch W, Knappe J, Schultz S und Wagner AFV** (1999). Structure and mechanism of the glycyl radical enzyme pyruvate formate-lyase. *Nat. Struct. Biol.* 6969–6975
- Behrends, A** (1999) Physiologie und substratspezifische Proteinbildung denitrifizierender Bakterien mit der Fähigkeit zur anaeroben Oxidation kurzkettiger Alkane. Dissertation. Universität Bremen
- Beller HR, Spormann AM, Sharma PK, Cole JR und Reinhard M** (1996). Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1188–1196
- Beller HR und Spormann AM** (1997). Anaerobic activation of toluene and *o*-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *J. Bacteriol.* 179: 670–676
- Beller HR und Spormann AM** (1999). Substrate range of benzylsuccinate synthase from *Azoarcus* sp. strain T. *FEMS Microbiol. Lett.* 178: 147–153
- Beller HR, Kane SR, Legler TC, McKelvie JR, Sherwood Lolla B, Pearson F, Balsler L und Mackay DM** (2008). Comparative assessments of benzene, toluene and xylene natural attenuation by quantitative polymerase chain reaction analysis of a catabolic gene, signature metabolites, and compound-specific isotope analysis. *Environ. Sci. Technol.* 42: 6065–6072
- Biegert T und Fuchs G** (1995). Anaerobic oxidation of toluene (analogues) to benzoate (analogues) by whole cells and by cell extracts of a denitrifying *Thauera* sp. *Arch. Microbiol.* 163: 407–417

- Biegert T, Fuchs G und Heider J** (1996). Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *Eur. J. Biochem.* 238: 661–668
- Birch LD und Bachofen R** (1988). Microbial production of hydrocarbons. In: *Biotechnology, Vol. 6b, Special Microbial Processes*. Hrsg. Rehm HJ und Reed G, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Boll M, Fuchs G und Heider J** (2002). Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 604–611
- Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254
- Broillet MC** (1999). S-nitrosylation of proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 1036–1042
- Buckel W und Golding BT** (2006). Radical enzymes in anaerobes. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 27–49
- Callaghan AV, Gieg LM, Kropp KG, Suflita J und Young LY** (2006). Comparison of mechanisms of alkane metabolism under sulfate-reducing conditions among two bacterial isolates and a bacterial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4274–4282
- Callaghan AV, Wawrik B, Ní Chadhain SM, Young LY und Zylstra GJ** (2008). Anaerobic alkane-degrading strain AK-01 contains two alkylsuccinate synthase genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366: 142–148
- Callaghan AV, Tierney M, Phelps CD, und Young LY** (2009). Anaerobic biodegradation of *n*-hexadecane by a nitrate-reducing consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 1339–1344
- Coschigano PW, Wehrman TS und Young LY** (1998). Identification and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: putative role of a glycine free radical. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1650–1656
- Coschigano PW** (2000). Transcriptional analysis of the *tutE tutFDGH* gene cluster from *Thauera aromatica* Strain T1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1147–1151
- Cravo-Laureau C, Hirschler-Réa A, Matheron R und Grossi V** (2005). Anaerobic *n*-alkane metabolism by a sulfate-reducing bacterium, *Desulfatibacillum aliphaticivorans* strain CV2803T. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3458–3467
- Davidova IA, Duncan KE, Choi OK und Suflita JM** (2006). *Desulfoglaeba alkanexedens* gen. nov., sp. nov., an *n*-alkane degrading sulfate reducing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2737–2742
- Dennis M und Kolattukudy PE** (1992). A cobalt-porphyrin enzyme converts a fatty aldehyde to a hydrocarbon and CO. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5306–5310

- Ding H und Demple B** (2000). Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 5146–5150
- Dolan JR** (2005) Biogeography of aquatic microbes. *Aquat. Microb. Ecol.* 41: 39–48
- Duboc-Toia C, Hassan AK, Mulliez E, Ollagnier-de Choudens S, Fontecave M, Leutwein C und Heider J** (2003). Very high-field EPR study of glycy radical enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 38–39
- Duppel W, Lebeault JM und Coon MJ** (1973). Properties of a yeast cytochrome P-450-containing enzyme system which catalyzes the hydroxylation of fatty acids, alkanes, and drugs. *Eur. J. Biochem.* 36: 583–592
- Ehrenreich P, Behrends A, Harder J und Widdel F** (2000). Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 173: 58–64
- Eliasson R, Fontecave M, Jörnvall H, Krook M, Pontis E und Reichard P** (1990). The anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase from *Escherichia coli* requires S-adenosylmethionine as a cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 3314–3318
- Feil C** (2006). Biochemie des anaeroben Toluol-Stoffwechsels von *Thauera aromatica*. Dissertation. Technische Hochschule Darmstadt
- Fennewald M, Benson S, Oppici M und Shapiro J** (1979) Insertion element analysis and mapping of the Pseudomonas plasmid alk regulon. *J. Bacteriol.* 139: 940–952
- Frey PA, Hegeman AD und Reed GH** (2006). Free radical mechanisms in enzymology. *Chem. Rev.* 106: 3302–3316
- Frey PA, Hegeman AD und Ruzicka FJ** (2008). The Radical SAM Superfamily. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 43: 63–88
- Gibson J und Harwood CS** (2002). Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 345–369
- Giese B und Kretzschmar A** (1984). Radikalkettenreaktionen mit Maleinsäureanhydriden. Zur kontrathermodynamischen Stereoselektivität. In: *Chemische Berichte.* 117, 3175–3182
- Grossi V, Cravo-Laureau C, Guyoneaud R, Ranchou-Peyruse A und Hirschler-Réa A** (2008). Metabolism of n-alkanes and n-alkenes by anaerobic bacteria: a summary. *Org. Geochem.* 39: 1197–1203
- Grundmann O, Behrends A, Rabus R, Amann J, Halder T, Heider J und Widdel F** (2008). Genes encoding the candidate enzyme for anaerobic activation of n-alkanes in the denitrifying bacterium, strain HxN1. *Environ. Microbiol.* 10: 376–385
- Grunstein M und Hogness DS** (1975). Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 3961–3965

- Hanna K, Brauer CD und Germain P** (2004) Cyclodextrin-enhanced solubilization of pentachlorophenol in water. *J. Environ. Manage.* 71: 1–8
- Heider J** (2007). Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11: 188–194
- Himo F** (2005). C-C bond formation and cleavage in radical enzymes, a theoretical perspective. *Biochim. Biophys. Acta* 1707: 24–33
- Iida T, Sumita T, Ohta A und Takagi M** (2000). The cytochrome P450ALK multigene family of an n-alkane- assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*: Cloning and characterization of genes coding for new CYP52 family members. *Yeast* 16: 1077–1087
- Kane SR, Beller HR, Legler TC und Anderson RT** (2002). Biochemical and genetic evidence of benzylsuccinate synthase in toluene-degrading, ferric iron-reducing *Geobacter metallireducens*. *Biodegradation* 13: 149–154
- Keefe AD, Wilson DS, Seelig B und Szostak JW** (2001). One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag. *Protein Expr. Purif.* 23: 440–446
- Kessler D, Herth W und Knappe J** (1992). Ultrastructure and pyruvate formate-lyase radical quenching property of the multienzymic AdhE protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267: 18073–18079
- Knappe J, Neugebauer FA, Blaschkowski HP und Ganzler M** (1984). Post-translational activation introduces a free radical into pyruvate formate-lyase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 1332–1335
- Kniemeyer O und Heider J** (2001). Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme. *J. Biol. Chem.* 276: 21381–21386
- Kniemeyer O, Fischer T, Wilkes H, Glöckner FO und Widdel F** (2003). Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 760–768
- Kniemeyer O, Musat F, Sievert SM, Knittel K, Wilkes H, Blumenberg M, Michaelis W, Classen A, Bolm C, Joye SB und Widdel F** (2007). Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature.* 449: 898–901
- Kotani T, Kawashima Y, Yurimoto H, Kato N und Sakai Y** (2006). Gene structure and regulation of alkane monooxygenases in propane-utilizing *Mycobacterium* sp. TY-6 and *Pseudonocardia* sp. TY-7. *J. Biosci. Bioeng.* 102: 184–192
- Kube M, Heider J, Amann J, Hufnagel P, Kuhner S, Beck A, Reinhardt R und Rabus R** (2004). Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* 181: 182–194

- Lehtiö L, Grossmann JG, Kokona B, Fairman R und Goldman A** (2006). Crystal structure of a glycyl radical enzyme from *Archaeoglobus fulgidus*. *J. Mol. Biol.* 357: 221–235
- Leuthner B, Leutwein C, Schulz H, Hörth P, Haehnel W, Schiltz E, Schägger H und Heider J** (1998). Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol. Microbiol.* 28: 615–628
- Logan DT, Andersson J, Sjöberg BM und Nordlund P** (1999). A glycyl radical site in the crystal structure of a class III ribonucleotide reductase. *Science* 283: 1499–1504
- Mackay D und Shiu WY** (1981). A critical review of Henry's Law constants for chemicals of environmental interest. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 10: 1175–1199
- Maeng JH, Sakai Y, Tani Y und Kato N** (1996). Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of *n*-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. Strain M-1. *J. Bacteriol.* 178: 3695–3700
- Marquet A, Bui BT, Smith AG und Warren MJ** (2007). Iron-sulfur proteins as initiators of radical chemistry. *Nat. Prod. Rep.* 24: 1027–1040
- Morasch B und Meckenstock RU** (2005). Anaerobic degradation of p-xylene by a sulfate-reducing enrichment culture. *Curr. Microbiol.* 51: 127–130
- Müller JA, Galushko A, Kappler A und Schink B** (1999). Anaerobic degradation of *m*-cresol by *Desulfobacterium cetonicum* is initiated by formation of 3-hydroxybenzylsuccinate. *Arch. Microbiol.* 172: 287–294
- Musat F, Galushko A, Jacob J, Widdel F, Kube M, Reinhardt R, Wilkes H, Schink B und Rabus R** (2009). Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria. *Environ. Microbiol.* 11: 209–219
- Nnyepi MR, Peng Y und Broderick JB** (2007). Inactivation of *E. coli* pyruvate formate-lyase: role of AdhE and small molecules. *Arch. Biochem. Biophys.* 459(1): 1–9
- O'Brien JR, Raynaud C, Croux C, Girbal L, Soucaille P und Lanzilotta WN** (2004). Insight into the mechanism of the B12-independent glycerol dehydratase from *Clostridium butyricum*: preliminary biochemical and structural characterization. *Biochemistry* 43: 4635–4645
- Park MO** (2005). New pathway for long-chain *n*-alkane synthesis via 1-alcohol in *Vibrio furnissii* M1. *J. Bacteriol.* 187: 1426–1429
- Rabus R, Wilkes H, Schramm A, Harms G, Behrends A, Amann R und Widdel F** (1999). Anaerobic utilization of alkylbenzenes and *n*-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the beta-subclass of *Proteobacteria*. *Environ. Microbiol.* 1: 145–157

- Rabus R, Wilkes H, Behrends A, Armstroff A, Fischer T, Pierik AJ und Widdel F** (2001). Anaerobic initial reaction of *n*-alkanes in a denitrifying bacterium: Evidence for (1-methylpentyl)succinate as initial product and for involvement of an organic radical in *n*-hexane metabolism. *J. Bacteriol.* 183: 1707–1715
- Raynaud C, Sarcabal P, Meynial-Salles I, Croux C und Soucaille P** (2003). Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 5010–5015
- Rios-Hernandez LA, Gieg LM und Suflita JM** (2003). Biodegradation of an alicyclic hydrocarbon by a sulfate-reducing enrichment from a gas condensate-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 434–443
- Rosenberg E** (2006). Hydrocarbon-oxidizing bacteria. In: *The prokaryotes*; 3rd Edition, Springer Verlag, New York
- Rossello-Mora R und Amann R** (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 2539–2567
- Rueter P, Rabus R, Wilkes H, Aeckersberg F, Rainey FA, Jannasch HW und Widdel F** (1994). Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature* 372: 455–458
- Schägger H** (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* 1: 16–22
- Schmidt TG und Skerra A** (1993). The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng.* 6: 109–122
- Schmidt TG, Koepke J, Frank R und Skerra A** (1996). Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J. Mol. Biol.* 255: 753–766
- Selmer T und Andrei PI** (2001). *p*-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile*. A novel glycol radical enzyme catalysing the formation of *p*-cresol. *Eur. J. Biochem.* 268: 1363–1372
- Selmer T, Pierik AJ und Heider J** (2005). New glycol radical enzymes catalysing key metabolic steps in anaerobic bacteria. *Biol. Chem.* 386: 981–988
- Shinoda Y, Akagi J, Uchihashi Y, Hiraishi A, Yukawa H, Yurimoto H, Sakai Y und Kato N** (2005). Anaerobic degradation of aromatic compounds by *Magnetospirillum* strains: isolation and degradation genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 1483–1491
- Smith DB und Johnson K** (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31–40
- So CM und Young LY** (1999). Isolation and characterization of a sulfate reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2969–2976

- So CM, Phelps CD und Young LY** (2003). Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids by a sulfate-reducing bacterium, strain Hxd3. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3892–3900
- Sofia HJ, Chen G, Hetzler BG, Reyes-Spindola JF und Miller NE** (2001). Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res.* 29: 1097–1106
- Terpe, K** (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 523–533
- Thauer RK und Shima S** (2008). Methane as fuel for anaerobic microorganisms. *Ann. NY Acad. Sci.* 1125: 158–170
- Tissot BP und Welte DH** (1984). Petroleum formation and occurrence. 2nd Edition, Springer Verlag, Berlin
- van Beilen JB, Marin MM, Smits TH, Rothlisberger M, Franchini AG, Witholt B und Rojo F** (2004). Characterization of two alkane hydroxylase genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Environ. Microbiol.* 6: 264–273
- van Beilen JB und Funhoff EG** (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 13–21
- Washer CE und Edwards EA** (2007). Identification and expression of benzylsuccinate synthase genes in a toluene-degrading methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1367–1369
- Webner K** (2008). Genexpression des anaeroben Alkanabbaus in dem denitrifizierenden Betaproteobakterium OcN1. Diplomarbeit. Universität Bremen
- Widdel F, Boetius A und Rabus R** (2006). Anaerobic biodegradation of hydrocarbons including methane. In: *The prokaryotes*; 3rd Edition, Springer Verlag, New York
- Widdel F und Rabus R** (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 259–276
- Wilkes H, Kuehner S, Bolm C, Fischer T, Classen A, Widdel F und Rabus R** (2003). Formation of *n*-alkane- and cycloalkane-derived organic acid during anaerobic growth of a denitrifying bacterium with crude oil. *Org. Geochem.* 34: 1313–1323
- Winderl C, Schaefer S und Lueders T** (2007). Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifers using benzylsuccinate synthase (*bssA*) genes as a functional marker. *Environ. Microbiol.* 9: 1035–1046
- Winderl C, Anneser B, Griebler C, Meckenstock RU, Lueders T** (2008). Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 792–801

- Yakimov MM, Timmis KN und Golyshin PN** (2007). Obligate oil degrading marine bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18: 257–266
- Young LY und Phelps CD** (2005). Metabolic biomarkers for monitoring *in situ* anaerobic hydrocarbon degradation. *Environ. Health Perspect.* 113: 62–67
- Yu L, Blaser M, Andrei PI, Pierik AJ und Selmer T** (2006). 4-Hydroxyphenylacetate decarboxylases: properties of a novel subclass of glycyl radical enzyme systems. *Biochemistry* 45: 9584–9592
- Zengler K, Heider J, Rossello-Mora R und Widdel F** (1999). Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of *Blastochloris sulfoviridis*. *Arch. Microbiol.* 172: 204–212

G Anhang

Primer Sequenzen

Primer-Name	Sequenz (5' → 3')
Vektor-Sequenzierprimer	
pCC1 Fosmid Sequenzierprimer FW	GGATGTGCTGCAAGGCGATT
pCC1 Fosmid Sequenzierprimer REV	GTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC
fw Sequenzierprimer für pET 42	TAATACGACTCACTATAGG
rev Sequenzierprimer für pET 42	
(T7 Terminator Primer)	GCTAGTTATTGCTCAGCGGT
fw Sequenzierprimer pT7- SBR2	CTATCATGCCATACCGCGAAAGG
rev Sequenzierprimer pT7- SBR2	CTGCGTTCTGATTTAATCTG
T3 Promotor-Sequenzierprimer	ATTAACCCTCACTAAAG
T7 Promotor Sequenzierprimer	TAATACGACTCACTATAGGG
M13 forward Sequenzierprimer	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 reverse Sequenzierprimer	CAGGAAACAGCTATGAC
OcN1-Fosmid-Sequenzierprimer (für Shotgun-Klone und Fosmid-Klon)	
OG 87	CTGAGTGTGACGCGTAGTT
OG 88	GCCAATAGCTGGATGCTCAA
OG 89	CTGCGTCAGAACTACAACCC
OG 90	GTCGATGCCGGCCGTCTCACA
OG 91	GGGAACGCTCCGCTTAGGTTT
OG 92	CACGATAGCGAACCTTCACA
OG 93	CGGACATTGTCCGAACTGAA
OG 94	GGCTGATCGAACCGTTCTAC
OG 95	CACTAAATCCGCTGCTTCCC
OG 96	CTGGCTTAACTATGCGGCAT
OG 97	ACAGATAGGTCGGCCATGAA
OG 98	AGAGATTGGAGTTTCGGTGC
OG 99	TTCGACAATCTCGGCCTCGT
OG 100	TAAACCTCGTTGGACTGGAC
OG 101	TTCGAGGCGCTCAACTGATA
OG 102	AATGAAAGCCGGCAGTACGC
OG 103	AAAGACAGGTTAGCGGTGGC
OG 104	AGGACTGTCGTTTCGTCGGTA
OG 105	GGCTATTCACTGCTGACGAT
OG 106	ACACCTAGGAAACCACCGCT
OG 107	GCAGATGCAGGAAGCGATGT

Anhang

OG 108	CCGGAATTGCGAACGAACCT
OG 109	CTGGGCGGAATCTAATGATG
OG 111	AAGCGCATCGCATGGAGCAA
OG 112	CTGTGACAAATTACCCTCAG
OG 113	GCCAGCTTCTCTGTTTAAACA
OG 126	GTGAAGTCCTGCGACATGTA
OG 127	TGCATAGCCAGCGCACTAAT
OG 128	ATAACTGCGCCTGCTTGCAA
OG 129	TGCAACCGTAACTCTGTCCA
OG 130	TGGACAGAGTTACGGTTGCA
OG 131	CTGGTGCCAGAACAAGTATC
OG 132	CCGAACGATTCATCGTCGAT
OG 133	CTTGCTGACATAGTGTGGT
OG 134	CGACAATCACCATATCCGGA
OG 135	TTGGTGTTGATCTGCAGTCC
OG 136	ATTAATCGTCTCCGCCAAGG
OG 222	TAATTTGCGCGGAGCATGAA
OG 223	CGGTAGCCGCAGATAACTTA
OG 224	AAGGTCTTCAGGGTGTCCT
OG 225	AGTGACACCCTGAAGACCTT
OG 226	ACCGGCTACACGAACGATAA
OG 227	GATGAACTGAAGCGGGAAGT
OG 228	TTCCTGAGAGTGCTAACCAG
OG 229	GGATTCATGCGGCAAATTGC

Sequenzierprimer für *mas*-PCR Produkte in Stamm Pnd3 und Stamm TD3

OG 230 (TD3)	TCAAGACCGGTCTCAACAGA
OG 231 (TD3)	ACGTGTACCAGCAAAACCTC
OG 240 (Pnd3)	GTCCATGGTCAACGAGGAAG
OG 241 (Pnd3)	TTCAGAACTGGGACGCCATG
OG 242 (Pnd3)	TGAACGTCGACAAAACCCTC
OG 243 (Pnd3)	AAGATGGTGAATACGCCCT
OG 244 (Pnd3)	AGGGCGTATTCCACCATCTT
OG 245 (Pnd3)	CGCGGTCAAAAAGCTGGTTT
OG 246 (Pnd3)	CTCGGCCGTTTTGAAATCCT
OG 247 (Pnd3)	AGGATTTCAAAACGGCCGAG
OG 251 (Pnd3)	AGTTCTTGGACAGACTGGTC
OG 252 (Pnd3)	AGTATCCGTAGGCGGAGGAA
OG 253 (Pnd3)	AGCTCATGTCATGTTCTCCC

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich in meiner Zeit am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Friedrich Widdel, der mir durch sein entgegengebrachtes Vertrauen die Möglichkeit gab, an diesem Thema zu arbeiten und meinen Werdegang stets gefördert hat.

Vielen Dank an PD Dr. Jens Harder für die Übernahme des Gutachtens und Prof. Ulrich Fischer für die Teilnahme am Prüfungskomitee.

Dr. Olav Grundmann danke ich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit. Die stetigen Anregungen und intensiven Diskussionen, sowie die freundschaftliche Zusammenarbeit haben einen großen Anteil an dem Gelingen der Arbeit. Vielen Dank für die unermüdliche Motivation zu selbständigem, fokussiertem Arbeiten.

Einen herzlichen Dank auch an Ingrid Kunze und Christina Probian für ihre Unterstützung und die vielen kleinen Tipps und Tricks im Labor. Daneben danke ich Kirsten Webner für alle Mail-Anfragen, die ich zur Vollendung der Arbeit an sie stellen durfte.

Vielen Dank an Prof. Reinhard Pfitzner und Dr. Christine Dauelsberg von der Fachhochschule Oldenburg Ostfriesland Wilhelmshaven für die Synthese des Methylpentylsuccinat Standards.

Herzlich danken möchte ich auch allen aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Mikrobiologie, einschließlich der „München-Abwanderer“. Das nette und entspannte Arbeitsklima hat dazu beigetragen, dass ich mich in Bremen immer wohl gefühlt habe. Dabei geht ein besonderes Dankeschön an die morgendliche Kaffeerrunde mit Nadine und Tini als festem Kern - die Arbeit startet besser mit einem Lächeln. Auch vielen lieben Dank an Lars, Mirko und Thomas für die schwungvolle Unterhaltung während und nach der Arbeit.

Abschließend geht mein Dank an meine Familie und Freunde, die mit mir durch alle Höhen und Tiefen meiner Promotionszeit gegangen sind. Vielen Dank dafür!