

Metabolische Regulation und Rekonstruktion
bei *Desulfobacterium autotrophicum*

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

dem Fachbereich Biologie / Chemie
der Universität Bremen vorgelegt von

Judith Amann

Bremen 2004

Die Untersuchungen zur vorliegenden Doktorarbeit wurden in der Zeit von Juli 2001 bis Oktober 2004 am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Widdel
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Ralf Rabus

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

ACS	Acetyl-CoA-Synthase
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BEB	Basic Equilibration Buffer
BLAST	Basic Local Alignment Tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CAP	Cold Acclimation Protein
CHAPS	3-[(Cholamidopropyl)-Dimethylalminol]-1-Propanosulfat
CODH	Kohlenmonoxid-Dehydrogenase
CSP	Cold Shock Protein
CT	Cycle Treshold
2DE	zweidimensionale Gelelektrophorese
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DH	Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSR	dissimilatorische Sulfitreduktase
DTT	1,4-Dithio-L-Threitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kDa	Kilodalton
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation
MS	Massenspektrometrie
MW	Molecular Weight

OD ₆₆₀	Optische Dichte bei 660 nm
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerasekettenreaktion
RGB	Resolving Gel Buffer
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	Peptide Mass Fingerprint
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per Minute
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SRB	Sulfatreduzierende Bakterien
STE	Saline Tris EDTA
TAE	Tris Acetat EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TOF	Time of Flight
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

INHALT

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG.....	5
1.1 Ökologische Bedeutung sulfatreduzierender Bakterien	5
1.2 Physiologische und phylogenetische Diversität sulfatreduzierender Bakterien.....	8
1.2.1 Morphologie	8
1.2.2 Phylogenie	8
1.2.3 Metabolische Vielfalt	10
1.2.4 Molekulares Verständnis des Metabolismus	11
1.2.4.1 <i>Dissimilatorische Sulfatreduktion</i>	11
1.2.4.2 <i>Hydrogenasen</i>	13
1.2.4.3 <i>Cytochrome</i>	15
1.2.4.4 <i>Mechanismen der Endoxidation – CI-Weg</i>	17
1.2.4.5 <i>Abbauwege ausgewählter Substrate</i>	20
1.2.5 Kälteanpassung.....	22
1.3 Untersuchte Bakterienstämme.....	23
1.3.1 <i>Desulfovibrio vulgaris</i>	23
1.3.2 <i>Desulfotalea psychrophila</i>	24
1.3.3 <i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	24
1.4 Stand der Genomforschung bei sulfatreduzierenden Bakterien	25
1.4.1 Von der DNA zur Vorhersage der Genfunktion.....	25
1.4.2 Genomprojekte mit Sulfatreduzierern	27
1.5 Strategien der funktionalen Genomforschung.....	28
1.5.1 Transkriptomik	28
1.5.2 Proteomik	31
1.6 Bearbeitete Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit	35
2 MATERIAL UND METHODEN	37
2.1 Chemikalien und Gase.....	37
2.2 Bakterienstämme:	37
2.3 Mikrobiologische Methoden.....	38
2.3.1 Herstellung von Kulturmedien	38
2.3.2 Herstellung der Medienzusätze und Substrate.....	39

2.3.3	Stammhaltung	43
2.3.4	Zellsuspensionsversuche	43
2.3.5	Wachstumsversuche mit Substratgemischen	44
2.3.6	Massenanzuchten und Zellernten	44
2.4	Chemische Analysen	45
2.4.1	Sulfidbestimmung	45
2.4.1.1	<i>Herstellung der Standardlösung für die Sulfidbestimmung</i>	45
2.4.1.2	<i>Erstellung einer Eichgeraden</i>	46
2.4.1.3	<i>Herstellung der benötigten Lösungen</i>	47
2.4.1.4	<i>Sulfidbestimmung</i>	47
2.4.2	Bestimmung organischer Säuren und Alkohole durch HPLC	48
2.4.3	Cytochromanalyse	48
2.5	Biochemische und molekularbiologische Methoden	49
2.5.1	Zweidimensionale Gelelektrophorese:	49
2.5.1.1	<i>Zellaufschluss</i>	49
2.5.1.2	<i>Proteinbestimmung</i>	50
2.5.1.3	<i>Isoelektrische Fokussierung</i>	51
2.5.1.4	<i>Equilibrierung</i>	52
2.5.1.5	<i>SDS-PAGE</i>	54
2.5.1.6	<i>Färbemethoden</i>	56
2.5.1.7	<i>Gelauswertung</i>	59
2.5.1.8	<i>Konservierung der Gele</i>	60
2.5.1.9	<i>Analyse ausgestochener Proteinspots</i>	60
2.5.2	Transkriptanalyse	60
2.5.2.1	<i>RNA Isolierung</i>	61
2.5.2.2	<i>cDNA Synthese</i>	63
2.5.2.3	<i>PCR</i>	63
2.5.2.4	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	65
2.5.2.5	<i>Real-Time PCR</i>	65
2.5.2.6	<i>DNA-Sequenzierung</i>	68
2.5.2.7	<i>Verwendete Primer</i>	69
2.6	Bioinformatische Arbeiten	70

3	ERGEBNISSE	71
3.1	Analyse der Temperaturanpassung von <i>Desulfobacterium autotrophicum</i> mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese	71
3.2	Regulation des Abbaus von Alkoholen in <i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	75
3.2.1	Physiologische Versuche.....	75
3.2.1.1	<i>Zellsuspensionsversuche</i>	75
3.2.1.2	<i>Wachstumsversuche</i>	76
3.2.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	80
3.2.2.1	<i>3.2.2.1 2D-Gele (Silber-Färbung)</i>	80
3.2.2.2	<i>Quantifizierung relativer Proteinhäufigkeit mit SYPRO™ Ruby</i>	81
3.2.2.3	<i>Proteinidentifizierung</i>	84
3.2.3	Bioinformatische Analyse der Alkohol-Dehydrogenase.....	86
3.2.3.1	<i>Genomischer Kontext des identifizierten adh Gens</i>	86
3.2.3.2	<i>Gene für Alkohol-Dehydrogenasen bei verschiedenen Sulfatreduzieren – Phylogenie</i>	87
3.2.4	Analyse des <i>adh</i> Gens von <i>Db. autotrophicum</i> Transkriptionsebene mittels Real-Time RT PCR.....	88
3.2.5	Vergleichende physiologisch / proteomische Analyse bei <i>Dv. vulgaris</i> und <i>Dt. psychrophila</i>	89
3.3	Untersuchung der Methylmalonyl-CoA-Mutase (Propionatabbau) von <i>Db. autotrophicum</i> auf Transkriptebene	91
3.3.1	Identifizierung von Genen des Methylmalonyl-CoA Stoffwechselwegs.....	91
3.3.2	Physiologische Versuche.....	92
3.3.3	Real-Time RT-PCR	93
3.4	CO-Dehydrogenase (terminale Oxidation).....	94
3.4.1	Genetische Umgebung der multimeren Acetyl-CoA-Synthase/CO-Dehydrogenase	95
3.4.2	Zusätzliche monomere CO-Dehydrogenasen (CODH 1 und 2).....	96
3.4.3	Expression der verschiedenen CODH Gene.....	97
3.5	Metabolische Rekonstruktion zentraler Stoffwechselwege bei <i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	98
3.6	Cytochromanalyse bei <i>Desulfotalea psychrophila</i> , <i>Desulfobacterium autotrophicum</i> und <i>Desulfovibrio vulgaris</i>	103

4	DISKUSSION	105
4.1	Analyse der Temperaturanpassung von <i>Desulfobacterium autotrophicum</i> mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese	105
4.2	Regulation der Alkohol-Dehydrogenase in <i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	108
4.2.1	Physiologische Experimente	108
4.2.2	Expressionsstudien auf Protein- und RNA Ebene	109
4.3	Regulation der Methylmalonyl-CoA-Mutase	113
4.3.1	Physiologische Experimente	113
4.3.2	Expressionsstudien.....	115
4.4	Untersuchung CO-Dehydrogenase kodierender Gene in <i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	116
4.5	Zusammenfassende Betrachtung – Regulation des Alkoholabbaus und weiterführender Stoffwechselwege.....	119
4.6	Metabolische Rekonstruktion ausgesuchter Stoffwechselwege bei <i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	120
4.7	Cytochromanalyse – Vergleich zwischen <i>Desulfobacterium autotrophicum</i> und <i>Desulfotalea psychrophila</i>	136
5	LITERATUR.....	139
	PUBLIKATIONEN	
	DANKSAGUNG	

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Anpassung des sulfatreduzierenden Bakteriums *Desulfobacterium autotrophicum* an wechselnde Kultivierungsbedingungen. Im Vordergrund standen Regulation und genomische Rekonstruktion von Stoffwechsellleistungen. Es wurden auf beiden Ebenen Vergleiche mit *Desulfovibrio vulgaris* und *Desulfotalea psychrophila* durchgeführt. Die Analyse zellfreier Extrakte des letzteren Organismus im Hinblick auf das Vorkommen von *c*-Typ Cytochromen stellte einen weiteren Teilaspekt der vorliegenden Arbeit dar.

1. Kälteanpassung von *Desulfobacterium autotrophicum*

Es wurden Proteinextrakte von Zellen, die an 4°C, 10°C und 28°C angepasst waren, elektrophoretisch aufgetrennt. Eine quantitative Auswertung ergab, dass zwei Proteine bei „28°C Zellen“ um den Faktor 11,07 bzw. 4,82 häufiger waren als bei „4°C Zellen“. Dem erstgenannten der beiden Proteine konnte einem ORF im Genom von *Db. autotrophicum*, welcher für ein Peroxiredoxin kodiert, zugeordnet werden. Eine spezifische Proteinbildung wurde in „4°C Zellen“ nicht beobachtet. Die Anpassung an kalte Temperaturen geht bei *Db. autotrophicum* offenbar nicht mit der vermehrten Bildung von Kälteschockproteinen oder Kälteanpassungsproteinen einher, wie dies für andere Organismen beschrieben ist. Im Genom konnten jedoch 7 ORFs, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Kälteschockproteine kodieren, identifiziert werden. Während Wachstums- und Sulfatreduktionsraten von *Db. autotrophicum* bei kalten Temperaturen deutlich reduziert sind, kommt es zu keinen drastischen Veränderungen der Proteinausstattung. Lediglich eine Änderung in der Fettsäurezusammensetzung der Zellmembran konnte im Verlauf vorhergegangener Untersuchungen festgestellt werden (Rabus et al. 2002).

2. Regulation ausgewählter kataboler Schritte

Der Abbau von Alkoholen wurde mit verschiedenen Methoden eingehend untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Alkoholabbau bei *Db. autotrophicum* reguliert wird. Die Bildung einer Alkohol-Dehydrogenase (ADH) wird in Gegenwart von alkoholischen Substraten induziert. Das *adh* Gen konnte identifiziert werden und es zeigte sich, dass es sich um eine eisenabhängige ADH handelt. Gene eines Zwei-Komponenten-Regulationssystems befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum *adh* Gen. Dieses

Zwei-Komponenten System ist vermutlich in die Regulation der *adh* Expression involviert. Wachstumsversuche haben ergeben, dass Laktat und 1-Propanol gleichzeitig abgebaut werden, wobei es zur Ausscheidung von Acetat und Propionat kommt. Im Gegensatz dazu werden Laktat und Propionat nicht gleichzeitig abgebaut. Laktat ist das bevorzugte Substrat. So ist auch die Expression des *mut* Gens (Methylmalonyl-CoA-Mutase, ein Schlüsselenzym des Abbaus von Propionat/1-Propanol) nur beim Wachstum mit 1-Propanol hochreguliert, nicht aber, wenn die Zellen mit Laktat oder einem Laktat/1-Propanol Gemisch angezogen wurden. Die Regulation dieses weiterführenden Stoffwechselwegs ist also nicht immer mit der Regulation der *adh* Expression gekoppelt. Ein weiterer zentraler Stoffwechselweg ist der C1-Weg, durch den *Db. autotrophicum* in der Lage ist, einerseits Substrate zu CO₂ zu oxidieren (heterotroph), andererseits CO₂ zu fixieren (autotroph). Ein Schlüsselenzym dieses Wegs ist die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CODH). Es konnten drei *codh* Gene identifiziert werden und von allen drei konnten auch Transkripte nachgewiesen werden. Ein Gen kodiert, zusammen mit benachbarten Genen, höchstwahrscheinlich für eine Acetyl-CoA-Synthase/Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (ACS/CODH) und liegt in einem Cluster mit Genen, die für Enzyme des C1-Wegs kodieren. Die Gene werden sowohl bei autotrophen, als auch bei heterotrophen Wachstum exprimiert. Die beiden anderen CODH Gene liegen vereinzelt im Genom und lassen sich einer anderen Klasse von CODHs zuordnen. Sie waren beim Wachstum mit Laktat, verglichen mit dem Wachstum mit H₂/CO₂, stärker exprimiert.

3. Metabolische Rekonstruktion bei *Db. autotrophicum* und Genomvergleich

In der vorliegenden Arbeit wurden oben genannte Gene, sowie solche für Hydrogenasen, Sulfatreduktion u. a. identifiziert. Sie bildeten die Basis für die Rekonstruktion der Stoffwechsellösungen von *Db. autotrophicum* und einen Vergleich mit den bereits veröffentlichten Genomen von drei anderen Sulfatreduzierern (*Desulfotalea psychrophila*, *Desulfovibrio vulgaris* und *Archaeoglobus fulgidus*). Im Gegensatz zu *Dv. vulgaris* verfügen *Db. autotrophicum*, *Dt. psychrophila* und *A. fulgidus* über keine [Fe]-Hydrogenasen. [NiFeSe]-Hydrogenasen und [NiFe]-Hydrogenasen konnten bei *Db. autotrophicum* identifiziert werden. Sie sind mit hoher Wahrscheinlichkeit periplasmatisch lokalisiert, wohingegen bei *Dv. vulgaris* und *Dt. psychrophila* auch eine lösliche, cytoplasmatische Hydrogenase vorkommt. Der Hmc-Komplex, dem bei *Dv. vulgaris* eine zentrale Rolle beim transmembranen Elektronentransfer von den

periplasmatischen Hydrogenasen zur dissimilatorischen Sulfatreduktion im Cytoplasma zugewiesen wird, konnte bei *Db. autotrophicum* nicht identifiziert werden. Es wurden lediglich Gene gefunden, die für einen TpII c_3 Komplex kodieren könnten. Dieser Komplex kommt für eine ähnliche Rolle wie der Hmc-Komplex in Frage. Allen vier Sulfatreduzierern ist natürlich die Genausstattung für die dissimilatorische Sulfatreduktion gemeinsam. *Db. autotrophicum* teilt mit *A. fulgidus* noch die Gene für den C1-Weg. Eine CODH kommt auch bei *Dv. vulgaris* vor, nicht jedoch bei *Dt. psychrophila*.

4. Cytochromanalyse bei *Desulfotalea psychrophila*

Im Genom von *Dt. psychrophila* konnten keine der bekannten Gene für *c*-Typ Cytochrome identifiziert werden (Rabus et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Daten experimentell untermauert. Differenzspektren zellfreier Extrakte von *Dt. psychrophila* zeigten nicht die für *c*-Typ Cytochrome typischen Absorptionsmaxima, im Gegensatz zu zellfreien Extrakten von *Dv. vulgaris* und *Db. autotrophicum*. Ferredoxine oder Flavodoxine könnten bei *Dt. psychrophila* die Rolle periplasmatischer *c*-Typ Cytochrome übernehmen. So konnte ein Flavodoxin mit vorhergesagter periplasmatischer Lokalisation identifiziert werden.

1 EINLEITUNG

1.1 Ökologische Bedeutung sulfatreduzierender Bakterien

Sulfatreduzierende Bakterien (SRB) sind obligat anaerobe Mikroorganismen, die ihre Energie aus der dissimilatorischen Reduktion von Sulfat (SO_4^{2-}) zu Sulfid (H_2S) beziehen. SRB verwerten vor allem niedermolekulare organische Verbindungen als Elektronen- und C-Quellen, die meist Fermentationsprodukte darstellen. Aufgrund der Bedeutung der Sulfatreduktion für ihren Stoffwechsel sind SRB insbesondere in marinen Habitaten weit verbreitet. Hier beträgt die Sulfatkonzentration 28 mmol pro Liter. In Süßwasserhabitaten wurden Sulfatkonzentrationen von lediglich 0.01 bis 0.02 mmol pro Liter nachgewiesen (Widdel 1988), es sind jedoch auch Süßwasserseen mit bis zu 1.2 mmol pro Liter bekannt (Scholten et al. 2002). Auch in diesen Ökosystemen kommen sulfatreduzierende Mikroorganismen vor.

Sowohl in marinen als auch in Süßwasserhabitaten beschränkt sich das Vorhandensein von SRB auf die anoxischen Zonen der Sedimente. Ausnahmen sind hier Habitate mit einem anoxischen Wasserkörper, wie z.B. das Schwarze Meer (Widdel 1988). Aufgrund des höheren Sulfatgehalts in marinen Systemen spielen SRB hier eine größere Rolle als in Süßwasserhabitaten. An marinen Standorten können Sulfatreduzierer ca. 10% der Gesamtbakterienpopulation stellen (Purdy et al. 2001, 2002). An anderen Standorten wurden bis zu 23% nachgewiesen (Wieringa et al. 2000). Die Zusammensetzung von SRB Populationen kann von Standort zu Standort variieren. Sie ist komplex und ändert sich möglicherweise als Antwort auf veränderte Umweltfaktoren (Purdy et al. 2002). Auch die vertikale Verteilung von SRB im Sediment ist nicht gleichmäßig: so wurde bei einer Untersuchung mariner Sedimente ein SRB Maximum in den oberen 3 cm des Sediments festgestellt, welches mit einer Verarmung an Acetat und Laktat und einem Maximum der Sulfatreduktionsraten korreliert (Llobet-Brossa et al. 2002).

Den SRB kommt im globalen Kohlenstoffkreislauf eine wichtige Rolle zu. Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Übersicht über den Kohlenstoffkreislauf. Durch Primärproduktion wird CO_2 aus der Luft in organischen Kohlenstoff überführt. Aus toter Biomasse der Landpflanzen wird dieser Kohlenstoff letztlich durch heterotrophe Mikroorganismen (Pilze und Bakterien) wieder zu CO_2 oxidiert. Auch durch Verbrennen fossiler Brennstoffe durch den Menschen gelangt Kohlendioxid wieder in die Atmosphäre.

Es besteht ein ständiger Austausch zwischen dem Kohlendioxid der Atmosphäre und dem im Wasserkörper der Ozeane. Das Photosynthese betreibende Phytoplankton fixiert das Kohlendioxid und bildet große Mengen an Biomasse. Durch Atmung wird Kohlendioxid wieder frei. Die Remineralisierung der toten Biomasse (Detritus) erfolgt in der marinen Wassersäule primär durch aerobe Mikroorganismen und in den Sedimenten durch anaerobe Mikroorganismen. SRB spielen bei der anaeroben Remineralisierung eine wichtige Rolle, so ist z. B. bekannt, dass in küstennahen marinen Sedimenten bis zu 50% des organischen Materials durch Sulfatreduktion mineralisiert werden (Jørgensen 1982). Hier sind sie vor allem für die Endoxidation von Fermentationsendprodukten (z.B. Ethanol, Acetat, oder H_2) verantwortlich.

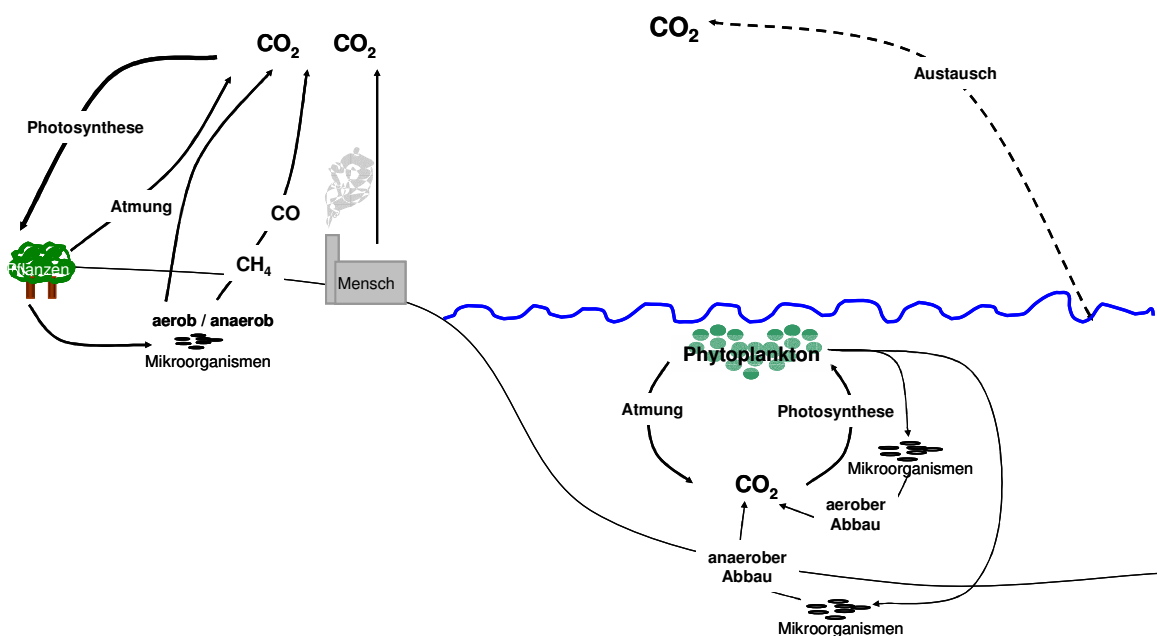


Abbildung 1.1 Kohlenstoffkreislauf: CO_2 wird durch photosynthetische Organismen fixiert und durch Atmung wieder freigesetzt. Anaerobe und aerobe Mikroorganismen sorgen jeweils für die Remineralisierung organischen Materials.

Auch im Schwefelkreislauf haben SRB, aufgrund ihrer Energiegewinnung durch dissimilatorische Sulfatreduktion, eine bedeutende Rolle. Abbildung 1.2 zeigt eine schematische Darstellung der wichtigsten Prozesse des Schwefelkreislaufes. Schwefel kommt in der Biomasse in Aminosäuren und als Cofaktor oder prosthetische Gruppe von Enzymen vor. Viele Organismen sind in der Lage, den für die Biosynthese benötigten reduzierten Schwefel durch assimilatorische Sulfatreduktion zu gewinnen. Das Freiwerden von Schwefel aus organischen Verbindungen durch mikrobiellen Abbau bezeichnet man

als Desulfuration. Anorganischer Schwefel kann in verschiedenen Oxidationsformen (SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, S, H_2S) vorliegen. Diese werden durch verschiedene, von Bakterien dominierte oder rein chemische, Prozesse ineinander überführt. Vor allem bei der Reduktion von Sulfat zu Sulfid spielen Sulfatreduzierer eine wichtige Rolle.

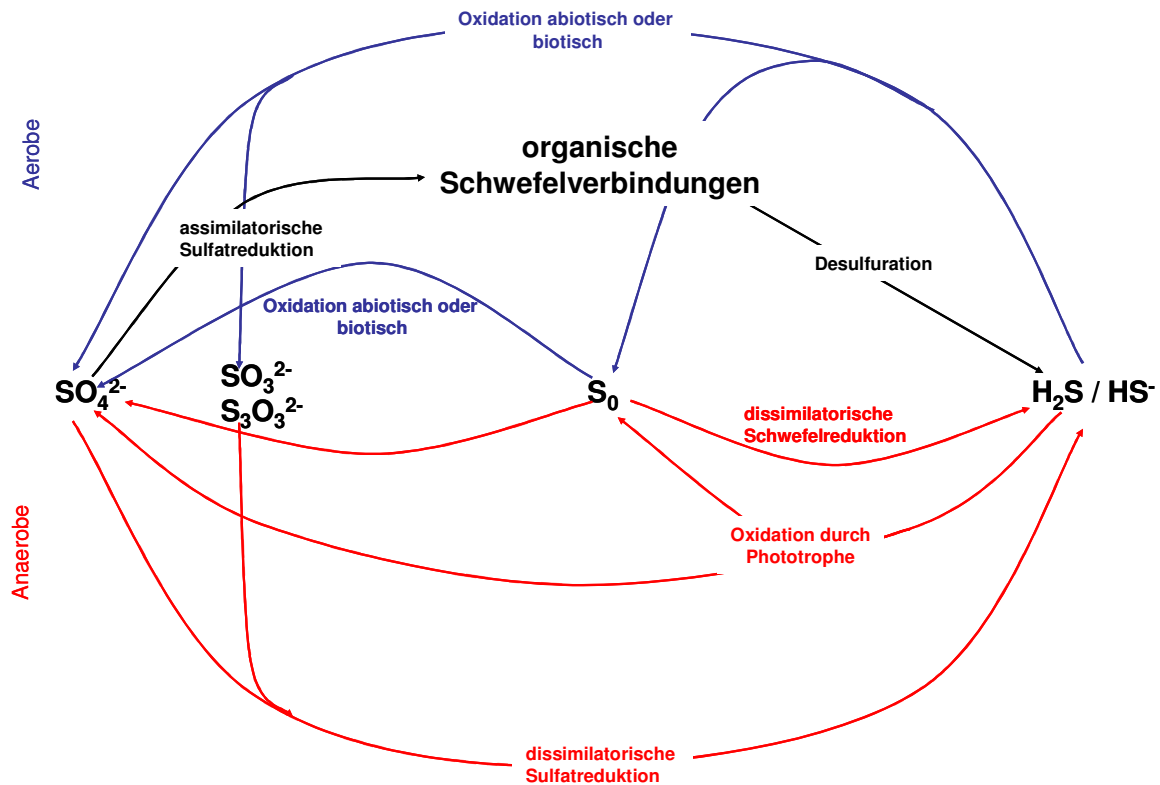


Abbildung 1.2 Schwefelkreislauf: Die Umwandlung von Schwefel in seine verschiedenen Oxidationsformen kann aerob (blau) oder anaerob (rot) ablaufen. Elementarer Schwefel wird durch Desulfuration aus organischen Schwefelverbindungen freigesetzt und abiotisch oder biotisch zu Sulfat oxidiert. Dieses wird durch assimilatorische Sulfatreduktion reduziert, um in organische Verbindungen eingebaut zu werden oder es wird durch die dissimilatorische Sulfatreduktion zu Sulfid. Dieses kann abiotisch oder biotisch wieder zu Sulfat oxidiert werden.

1.2 Physiologische und phylogenetische Diversität sulfatreduzierender Bakterien

Bei den sulfatreduzierenden Bakterien handelt es sich um eine morphologisch und physiologisch vielseitige Organismengruppe, deren gemeinsames Merkmal die namensgebende Fähigkeit zur dissimilatorischen Sulfatreduktion ist.

1.2.1 Morphologie

SRB verfügen über keine einheitliche Morphotypen. Es wurde schon eine Vielzahl von Morphotypen beschrieben. Viele SRB sind oval oder kleine Stäbchen. Vor allem bei Bakterien des Genus *Desulfovibrio* kommen Vibrionen vor. Auch filamentöse und spirilloide Zellen konnten schon beobachtet werden (Widdel und Bak 1992). Zellen sulfatreduzierender Bakterien sind oft beweglich. Sie können auch in Aggregaten vorliegen, so wie z.B. die Sarcinen-förmig angeordneten Zellen der Gattung *Desulfosarcina*. Die größten Zellformen sind bei den filamentösen Zellen der Gattung *Desulfonema* zu finden (Widdel und Bak 1992).

1.2.2 Phylogenie

Auf Grund von 16S-rRNA Sequenzanalysen lassen sich die Sulfatreduzierer in vier phylogenetische Gruppen unterteilen: (1) Gram-negative mesophile, (2) Gram-positive sporenbildende, (3) bakterielle thermophile und (4) archaeelle thermophile Sulfatreduzierer (Castro et al. 2000). Es wurden bislang nur wenige Spezies beschrieben, die den beiden letzten Gruppen zugehörig sind. Gram-negative mesophile SRB bilden die umfangreichste Gruppe. Sie werden den Deltaproteobacteria zugeordnet. Abbildung 1.3 zeigt die phylogenetische Stellung der Deltaproteobacteria innerhalb der Bacteria. Man unterteilt die Gram-negativen mesophilen SRB in zwei Familien: die *Desulfovibrionaceae* und die *Desulfobacteriaceae*. Die *Desulfovibrionaceae* umfassen dabei die Genera *Desulfovibrio* und *Desulfomicrobium*. Die restlichen Genera fallen in die Familie der *Desulfobacteriaceae* (Widdel und Bak 1992). Die Gram-positiven Sporenbildner gehören zu den „low GC“ Gram-positiven Bakterien, wie z.B. *Bacillus* oder *Clostridium* (Castro et al. 2000).

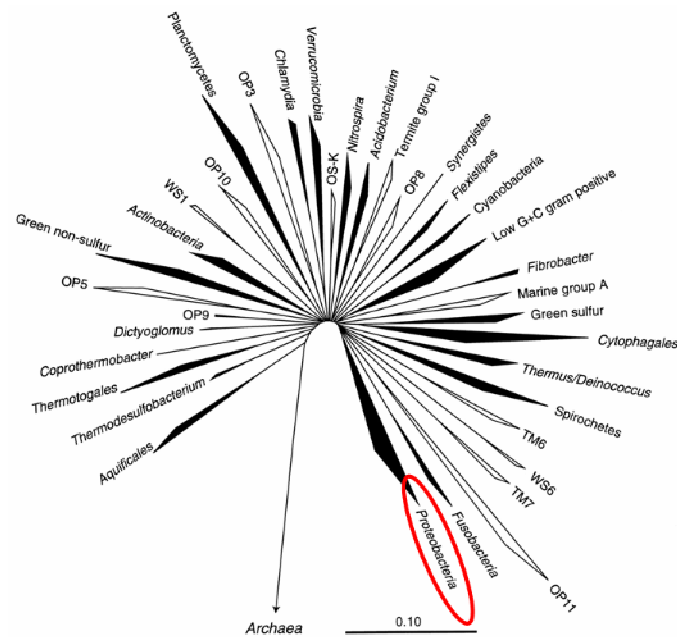


Abbildung 1.3 Dieser Stammbaum (Hugenholtz et al. 1998) zeigt die phylogenetische Stellung der Proteobacteria (rot umrandet) innerhalb der Bacteria.

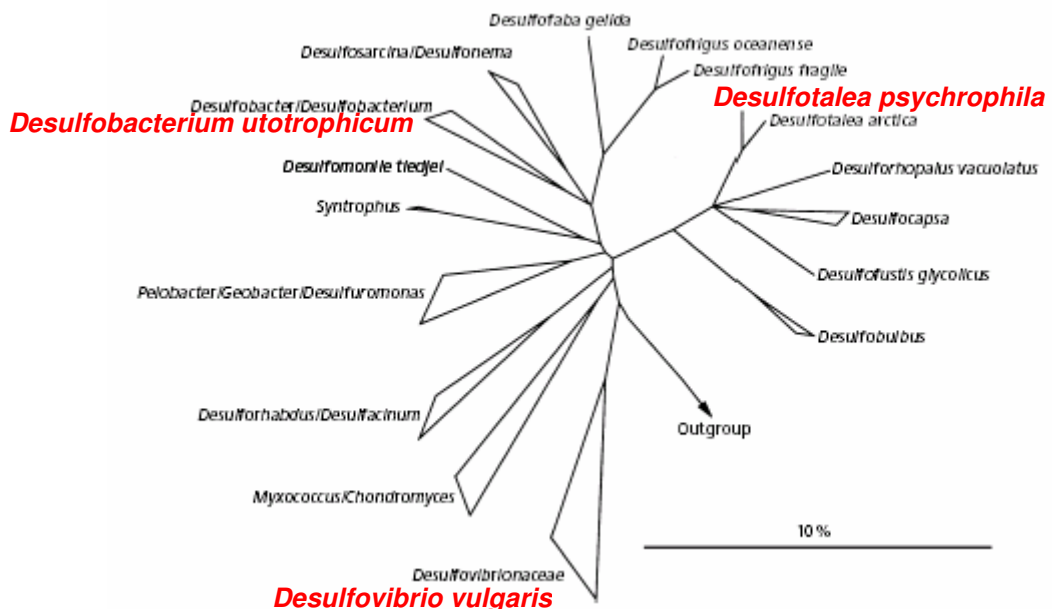


Abbildung 1.4 Der Stammbaum (verändert nach Knoblauch et al. 1999) zeigt die phylogenetische Stellung der drei in der vorliegenden Arbeit untersuchten Organismen (in rot hervorgehoben) innerhalb der Deltaproteobacteria.

Abbildung 1.4 zeigt einen schematischen Stammbaum, der die phylogenetische Stellung der untersuchten Organismen *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfobacterium autotrophicum* und *Desulfotalea psychrophila* innerhalb der Deltaproteobacteria darstellt. *Db. autotrophicum* und *Dv. vulgaris* sind Repräsentanten der beiden, bereits erwähnten, unterschiedlichen Familien: *Desulfobacteriaceae* und *Desulfovibrionaceae*.

1.2.3 Metabolische Vielfalt

Die Sulfatreduzierer sind durch die Fähigkeit zur dissimilatorischen Sulfatreduktion geeint. Als Elektronendonatoren können sie jedoch vielfältige organische Verbindungen nutzen, die dann gleichzeitig auch als C-Quelle dienen. Das Substratspektrum umfasst im Wesentlichen vielfältige niedermolekulare Substanzen wie Alkohole, Carbonsäuren und Fettsäuren, darunter auch Fermentationsendprodukte, wie z.B. Laktat, Pyruvat, Ethanol oder Propionat. Es können jedoch auch verzweigte Fettsäuren oder Aromaten abgebaut werden. Außerdem sind viele SRB in der Lage, molekularen Wasserstoff als Elektronendonator zu nutzen. Dies kann unter heterotrophen bzw. autotrophen Bedingungen mit Acetat bzw. CO₂ als anaboler C-Quelle erfolgen (Widdel 1988; Widdel und Bak 1992; Rabus et al. 1999). Auch Aldehyde und Ketone sind Substrate für SRB. Die Verwertung sekundärer Aldehyde und Ketone ist hingegen eher selten. Auch stickstoffhaltige Verbindungen wie z.B. Aminosäuren oder auch Anilin können von SRB oxidiert werden (Schnell et al. 1989). Vor kurzem wurde sogar die Verwertung von Zuckern beschrieben (Sass et al. 2002). Die Verwendung solcher komplexen Substrate stellt jedoch die Ausnahme dar.

SRB verfügen mit der dissimilatorischen Sulfatreduktion zwar über einen respirativen Stoffwechseltypus, viele sind jedoch in Abwesenheit geeigneter Elektronenakzeptoren auch zum fermentativen Wachstum fähig. Neben Sulfat, sind Thiosulfat oder Sulfit gängige Elektronenakzeptoren sulfatreduzierender Bakterien. Manche SRB sind auch in der Lage, Nitrat als alternativen Elektronenakzeptor zu nutzen (Widdel 1988; Rabus et al. 1999).

Man kann bei SRB grundsätzlich zwischen vollständigen und unvollständigen Oxidierern unterscheiden. Erstere sind in der Lage organische Substrate vollständig zu CO₂ zu oxidieren. Die unvollständigen Oxidierer scheiden meist Acetat als Endprodukt aus und sind häufig durch ein schnelleres Wachstum gekennzeichnet (Widdel 1988). Unter den vollständigen Oxidierern gibt es verschiedene biochemische Wege zur Endoxidation.

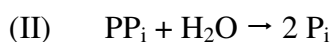
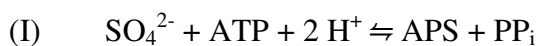
Während z.B. bei *Desulfobacter postgatei* die Existenz des Zitronensäurezyklus als Mechanismus zur Endoxidation nachgewiesen werden konnte (Brandis-Heep et al. 1983), nutzen andere Spezies den C1-Weg (Schauder et al. 1986). Letzterer scheint weiter verbreitet zu sein und man nimmt an, dass nur *Desulfobacter*-Spezies den Zitronensäurezyklus nutzen (Rabus et al. 1999).

Auch in Bezug auf das Spektrum ihrer Wachstumstemperaturen sind Sulfatreduzierer vielseitig. Neben vielen mesophilen Organismen wurden in den letzten Jahren auch immer mehr SRB isoliert, die als psychrophil einzuordnen sind. Ein Beispiel ist der in der vorliegenden Arbeit untersuchte *Desulfotalea psychrophila* (Knoblauch et al. 1999). Auch für das entgegengesetzte Ende des Temperaturspektrums gibt es Beispiele. Neben hypertermophilen Archaeen wie z.B. *Archaeoglobus fulgidus* (Stetter 1988), gibt es auch einige thermophile Vertreter unter den SRB (Zeikus et al. 1983). Da die Anpassung an kalte Temperaturen ein Teilaspekt der vorliegenden Arbeit ist, wird auf dieses Thema im Abschnitt 1.2.5 noch näher eingegangen.

1.2.4 Molekulares Verständnis des Metabolismus

1.2.4.1 Dissimilatorische Sulfatreduktion

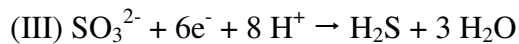
Die dissimilatorische Sulfatreduktion ist ein respirativer Stoffwechsellyp und dient somit der Energiegewinnung. Da es sich bei der dissimilatorischen Sulfatreduktion jedoch nicht um einen membrangebunden Prozess handelt, ist die genaue Entstehung des chemiosmotischen Gradienten noch ungeklärt. Die ATP-Synthese erfolgt jedoch mit diesem Gradienten als treibende Kraft durch ATP-Synthasen. Sulfat ist chemisch inert und das Redoxpotential der freien Anionen ist zu niedrig. Deshalb muss Sulfat zunächst, unter ATP-Verbrauch, zu Adenosin-5'-Phosphosulfat bzw. Adenosylsulfat (APS) aktiviert werden (Formel I).



Diese Reaktion wird durch die ATP-Sulfurylase katalysiert. Das Reaktionsgleichgewicht liegt jedoch auf der Seite der Reaktanten. Die irreversible Spaltung von Pyrophosphat durch eine Pyrophosphatase erlaubt es das Gleichgewicht auf die Seite der Produkte zu

verschieben (Formel II). APS ist der eigentliche Elektronenakzeptor und wird durch die APS-Reduktase reduziert. Es entsteht Sulfit bzw. seine protonierte Form Bisulfit und Adenosinmonophosphat (AMP). Bei SRB ist die APS-Reduktase ein Eisen-Schwefel-Flavoprotein mit einer heterodimeren Struktur ($\alpha\beta$) (Rabus et al. 1999).

Sulfit bzw. Bisulfit werden nun durch die dissimilatorische Sulfitreduktase (DSR) zu Sulfid reduziert (Formel III).



Dazu werden 6 Elektronen benötigt. Derzeit gibt es zwei Modelle für die Reduktion von Sulfit. Das erste geht davon aus, dass es drei aufeinanderfolgende Reduktionsschritte mit je zwei Elektronen gibt. Dabei werden Trithionat und Thiosulfat als Intermediate gebildet. Diese konnten zwar schon experimentell nachgewiesen werden, allerdings gibt es auch Hinweise, dass es sich bei der Bildung von Trithionat und Thiosulfat um Nebenprodukte handelt. Das andere Modell geht von einem direkten 6-Elektronenübergang aus, wie er auch bei der assimilatorischen Sulfatreduktion und der assimilatorischen Reduktion von SO_3^{2-} stattfindet. Dieses Modell wird auch durch die Ähnlichkeiten zwischen der dissimilatorischen Sulfitreduktase und der Nitritreduktase gestützt, die ebenfalls einen 6-Elektronenübergang katalysiert (Rabus et al. 1999). Bei Sulfatreduzierern gibt es verschiedene Typen der dissimilatorischen Sulfitreduktase, die nach ihren Absorptionsspektren und anderen molekularen Eigenschaften unterschieden werden. Man unterscheidet Desulfoviridin, Desulforubidin, Desulfofuscidin und P582. Je nach Typ ist die DSR aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut: häufig trifft man eine $\alpha_2\beta_2$ heterotetramere Struktur an. Manche DSR verfügen noch über eine γ -Untereinheit, deren genaue Funktion noch unbekannt ist. Die α - und die β -Untereinheit sind häufig in einem Operon kodiert (*dsrAB*), während das Gen der γ -Untereinheit (*dsrC*) getrennt davon liegt. Die Expression von *dsrC* erfolgt nicht koordiniert mit der *dsrAB* Gene (Karkhoff-Schweizer et al. 1993). Zwei weitere Gene, die im *dsr* Operon vorliegen, sind *dsrN* und *dsrD*. Für das Genprodukt von *dsrN* wurde gezeigt, dass es Ähnlichkeit mit einer Corbyrin a,c-diamid Synthase zeigt, ein Enzym, das normalerweise in die Vitamin B₁₂ Biosynthese involviert ist (Larsen et al. 2000). Für das Genprodukt von *dsrD* liegt eine Kristallstruktur vor. Da dort eine mögliche DNA-Interaktionsdomäne identifiziert werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um ein regulatorisches Protein handelt (Mizuno 2003).

Da auch Thiosulfat als alternativer Elektronenakzeptor genutzt werden kann, verfügen viele SRB über ein zusätzliches Enzym, die Thiosulfatreduktase. Sie reduziert Thiosulfat zu Sulfid bzw. Bisulfid.

1.2.4.2 Hydrogenasen

Hydrogenasen sind Enzyme, die in der Lage sind, die Umsetzung von H_2 zu $2H^+ + 2e^-$ und umgekehrt zu katalysieren. Bei Sulfatreduzierern spielen sie eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel, da durch sie das wichtige Gärungsprodukt Wasserstoff als Elektronendonator genutzt werden kann. Aber auch bei Sulfatreduzierern, die nicht in der Lage sind, mit Wasserstoff als Elektronendonator zu wachsen, konnten Hydrogenasen nachgewiesen werden. Bei Sulfatreduzierern sind verschiedene Typen von Hydrogenasen bekannt. Man unterteilt sie anhand ihres Gehalts an Metallatomen in verschiedene Klassen: [Fe]-Hydrogenasen, [NiFe]-Hydrogenasen und [NiFeSe]-Hydrogenasen (Rabus et al. 1999). Beim Wachstum mit H_2 als Elektronendonator haben periplasmatische Hydrogenasen die Funktion, Elektronen für die Sulfatreduktion und H^+ für die „proton-motive-force“ bereitzustellen.

Für das Wachstum mit Laktat wird das Modell des H_2 -Cycling diskutiert. Dieses Modell geht davon aus, dass eine cytoplasmatische Hydrogenase Elektronen und Protonen aus der Oxidation von Laktat zu H_2 umsetzt. Das gebildete H_2 diffundiert dann ins Periplasma und wird dort von periplasmatischen Hydrogenasen wieder zu Elektronen und Protonen oxidiert. Die Elektronen werden der dissimilatorischen Sulfatreduktion zugeführt, während die Protonen für die Generierung eines Protonengradienten sorgen. Das aus Laktat entstandene Pyruvat wird zu Acetyl-CoA decarboxyliert. Dabei entsteht CO_2 und je zwei Protonen und Elektronen. Es könnte auch Formiat entstehen (über eine Pyruvat-Formiat-Lyase), das ins Periplasma diffundiert. Dieses würde dann durch eine periplasmatische Formiat-Dehydrogenase in CO_2 , Elektronen und Protonen oxidiert. Eine dritte denkbare Reaktion – es konnte in *Dv. vulgaris* allerdings kein entsprechendes Enzym gefunden werden – ist die Generierung von Kohlenmonoxid und Wasser bei der Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA. Das Kohlenmonoxid kann dann durch eine CODH und einen Hydrogenase-Komplex zu CO_2 und H_2 , welches wiederum als Substrat periplasmatischer Hydrogenasen dienen kann, umgesetzt werden (Voordouw 2002). Der kürzliche Nachweis von Genen für eine cytoplasmatische Hydrogenase und eine periplasmatische Formiat-Dehydrogenase unterstützt diese Hypothese des H_2 -Cycling (Heidelberg et al. 2004). Es gibt allerdings auch eine Reihe von Argumenten, die gegen

dieses Modell sprechen. Zum einen wird das Wachstum mit Laktat und Sulfat nicht durch eine Wasserstoffatmosphäre unterdrückt. Zum anderen existiert eine *Desulfovibrio* Mutante, die nicht in der Lage ist, mit Wasserstoff zu wachsen, jedoch mit Laktat und Sulfat. Auch gibt es eine ganze Reihe von Sulfatreduzierern, die mit verschiedenen Substraten und Sulfat wachsen, nicht jedoch mit Wasserstoff, da sie keine Hydrogenasen haben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Produktion von H₂ gekoppelt an die Oxidation von Laktat zu Pyruvat ein energieabhängiger Prozess ist. Es spricht also einiges gegen eine tragende Rolle von Wasserstoff als Intermediat des Wachstums mit Laktat. Bei fermentativem Wachstum produzieren *Desulfovibrio* Spezies Wasserstoff und Kohlendioxid. Dass diese Reaktionen auch bei Anwesenheit von Sulfat nicht vollständig unterbunden werden, könnte das Auftreten von Wasserstoff beim Wachstum mit Laktat und Sulfat erklären (Rabus et al. 1999).

Hydrogenasen sind Heterodimere aus zwei Untereinheiten und oft periplasmatische Proteine. Es gibt allerdings auch Beispiele für membrangebundene Hydrogenase-Komplexe, z.B. Hydrogenase 4 bei *Escherichia coli* (Skibinski et al. 2002; Self et al. 2004) oder die Ech-Hydrogenase bei *Desulfovibrio gigas* (Rodrigues et al. 2003). Auch bei *Dv. vulgaris* sind membrangebundene Hydrogenase-Komplexe gefunden worden (Phorelic et al. 2002). Viele Sulfatreduzierer verfügen über multiple Hydrogenasen. Man nimmt an, dass diese möglicherweise unterschiedliche katalytische Eigenschaften besitzen, so dass die Bakterien möglichst gut an sich ändernde Wasserstoffkonzentrationen in ihrem natürlichen Habitat angepasst sind (Hansen 1994).

1.2.4.3 Cytochrome

Cytochrome sind bei Sulfatreduzierern weit verbreitet und ihnen wird eine Rolle als Elektronencarrier bei der Sulfatreduktion zugeschrieben. Cytochrome sind Proteine mit Häm als prosthetischer Gruppe. Eine Hämgruppe ist ein Porphyrinringsystem in dessen Mitte ein Eisenatom komplexiert ist. Das Eisenatom einer Hämgruppe kann in verschiedenen Redoxstadien (Fe^{2+} und Fe^{3+}) vorliegen, welche die Elektronencarrierfunktion ausmachen. Man kann verschiedene Klassen von Cytochromen unterscheiden: Cytochrom *a*, Cytochrom *b*, Cytochrom *c* und Cytochrom *d* (Jones und Poole 1985). Für Sulfatreduzierer sind vor allem die *b*-Typ und die *c*-Typ Cytochrome relevant. Die *c*-Typ Cytochrome zeichnen sich dadurch aus, dass die prosthetische Gruppe kovalent über Thioesterbrücken mit dem Protein verbunden ist (Smith 1978). Cytochrome konnten unter den periplasmatischen Proteinen bei verschiedenen *Desulfovibrio* Spezies nachgewiesen werden und man nimmt an, dass sie die Elektronencarriermoleküle für die periplasmatischen Hydrogenasen sind (Odom und Peck 1984). Für *Desulfomicrobium norvegicum* wurde nachgewiesen, dass die von der Hydrogenase gebildeten Elektronen zunächst auf ein c_3 Cytochrom (M_r 13000) übertragen werden. Dieses Cytochrom c_3 interagiert nicht nur mit einer [Fe]-Hydrogenase (ElAntak et al. 2003), sondern auch mit dem Hmc-Komplex. Hmc steht für „High molecular weight cytochrome“ und ist die Cytochromuntereinheit eines Transmembrankomplexes aus insgesamt 6 Untereinheiten, die alle von einem Operon kodiert werden (Keon und Voordouw 1996). Hmc verfügt über drei verschiedene Domänen und insgesamt 16 Hämgruppen. Hmc übernimmt die Elektronen von Cytochrom c_3 und leitet sie ins Cytoplasma weiter. Man nimmt an, dass der Hmc-Komplex als Verbindung zwischen der periplasmatischen Oxidation von Wasserstoff und der cytoplasmatischen Reduktion von Sulfat dient (Czjzek et al. 2002). Abbildung 1.5 fasst die Modellvorstellung über diesen Elektronenfluss von der Wasserstoffoxidation zur Sulfatreduktion schematisch zusammen. Cytochrom c_3 kann dabei sowohl mit den periplasmatischen Hydrogenasen, als auch mit dem Hmc-Komplex interagieren und Elektronen übernehmen. Da c_3 allerdings mit derselben Domäne an Hmc und an die Hydrogenase bindet, ist davon auszugehen, dass es nicht zu einem Komplex aus Cytochrom c_3 , Hydrogenase und Hmc kommt, sondern dass Cytochrom c_3 wie eine Art Shuttle funktioniert (ElAntak et al. 2003).

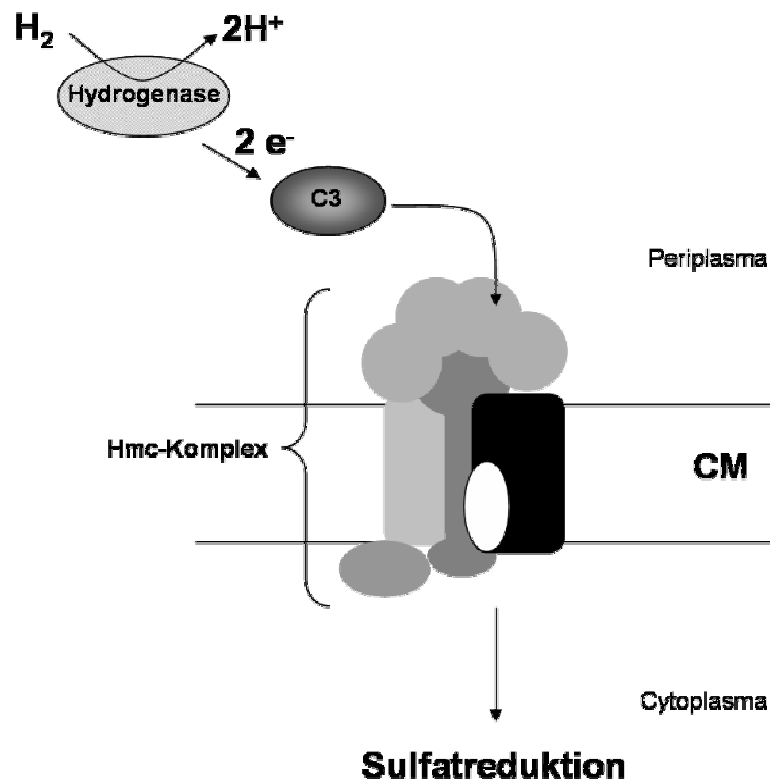


Abbildung 1.5 Elektronenfluß zwischen Wasserstoffoxidation und Sulfatreduktion bei *Desulfovibrio*; CM: cytoplasmatische Membran.

Cytochrome sind zwar bei *Desulfovibrio* Spezies am besten untersucht, konnten jedoch auch schon für viele andere Sulfatreduzierer experimentell nachgewiesen werden (für einen Überblick siehe: Widdel 1988). Es gibt allerdings auch Ausnahmen, wie z.B. *Desulfotalea psychrophila*, in dessen Genom keine Gene für *c*-Typ Cytochrome gefunden werden konnten (Rabus et al. 2004). Die experimentelle Überprüfung dieses bioinformatischen Befundes und die Frage nach alternativen Elektronentransportproteinen stellen einen Teilaspekt der vorliegenden Arbeit dar.

1.2.4.4 Mechanismen der Endoxidation – C1-Weg

Db. autotrophicum nutzt für die terminale Oxidation von Acetat den so genannten C1-Weg. Pro Molekül Acetat entstehen dabei zwei Moleküle Kohlendioxid (Schauder et al. 1986). Der C1-Weg ist in Abbildung 1.6 schematisch dargestellt.

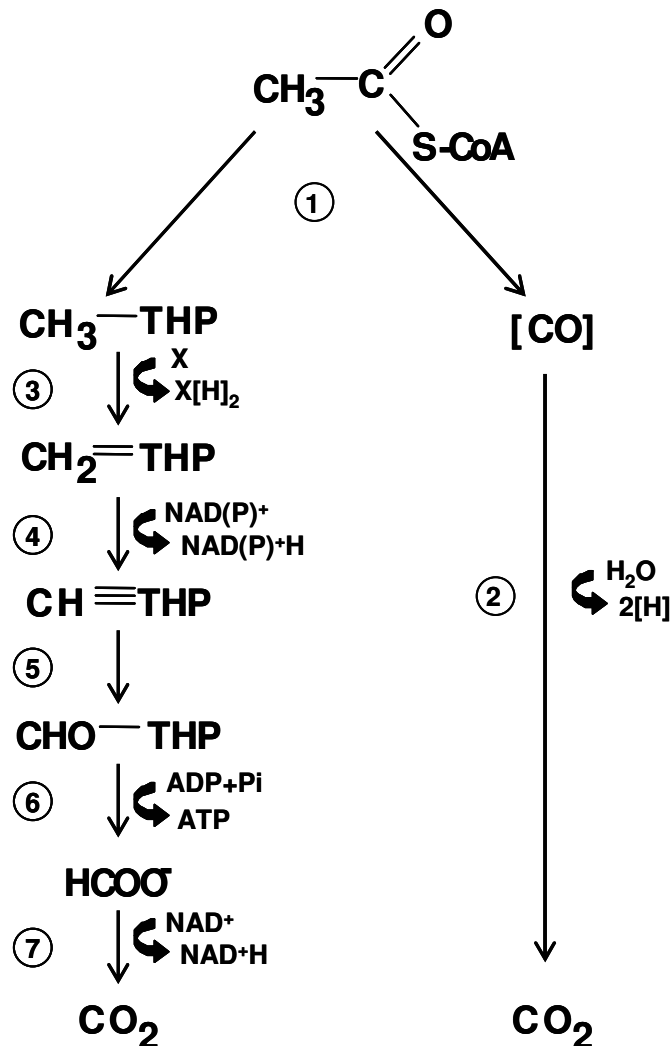


Abbildung 1.6 Endoxidation von Acetyl-CoA über den C1 Weg. Beteiligte Enzyme: ① Acetyl-CoA-Synthase, ② Kohlenmonoxid-Dehydrogenase, ③ Methyltetrahydropterin-Reduktase, ④ Methyltetrahydropterin-Dehydrogenase, ⑤ Methenyltetrahydropterin-Cyclohydrolase, ⑥ Formyltetrahydropterin-Synthase, ⑦ Formiat-Dehydrogenase; THP: Tetrahydropterin

Acetyl-CoA wird dabei in Kohlenmonoxid und eine Methylgruppe gespalten. Kohlenmonoxid kann dann von einer Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CODH) zu Kohlendioxid oxidiert werden. Die Methylgruppe wird auf ein Trägermolekül, im Falle von *Db. autotrophicum* handelt es sich um Tetrahydropterin (Länge et al. 1989; Schauder et al. 1989) übertragen. Gebunden an dieses Trägermolekül wird die Methylgruppe durch

eine Methyltetrahydropterin-Reduktase, eine Methyltetrahydropterin-Dehydrogenase und eine Methenyltetrahydropterin-Cyclohydrolase zu einer Formylgruppe oxidiert, die dann durch eine Formyltetrahydropterin-Synthase freigesetzt wird. Das entstandene Formiat wird durch eine Formiat-Dehydrogenase schließlich ebenfalls zu CO₂ oxidiert (Schauder et al. 1989). Die Umkehrung dieses Stoffwechselwegs wird von *Db. autotrophicum* auch zur Fixierung von Kohlendioxid verwendet. Unklar ist jedoch, ob die beteiligten Enzyme in beide Richtungen funktionieren, oder ob jeweils Isoenzyme vorliegen (Schauder et al. 1989).

Das zentrale Enzym des C1-Wegs ist die CODH. Dieses Enzym ist grundsätzlich zur reversiblen Oxidation von CO zu CO₂ in der Lage. Es gibt aber auch Enzymkomplexe mit weiteren Fähigkeiten. Je nach Aufbau und katalytischer Aktivität, lassen sich CODHs in verschiedene Klassen einteilen (Lindahl 2002). Abbildung 1.7 zeigt den schematischen Aufbau der verschiedenen Klassen und die Homologien für die einzelnen Untereinheiten.

Klasse I und II Enzyme sind zur Spaltung bzw. Synthese von Acetat und zur reversiblen Oxidation von Kohlenmonoxid in der Lage. Sie bilden einen Enzymkomplex aus fünf Untereinheiten (α , β , δ , γ , ϵ). Die α -Untereinheit der Klasse I/II Enzyme katalysiert die reversible Oxidation von Kohlenmonoxid, während die anderen Untereinheiten in die Acetyl-CoA Spaltung bzw. Synthese involviert sind. Die α -Untereinheit ist homolog zur β -Untereinheit der Klasse III Enzyme, die hier die Oxidation von Kohlenmonoxid übernimmt. Die γ - und δ -Untereinheiten übernehmen die Methylgruppe und übertragen sie auf das Trägermolekül. An dieses gebunden findet dann die Oxidation zunächst zu Formiat und schließlich zu Kohlendioxid statt (siehe Abbildung 1.6). Klasse I Enzyme werden bei autotrophen Methanogenen gefunden, während Klasse II Enzyme bei der acetoklastischen Methanogenese eine Rolle spielen (Lindahl 2002).

Auch Enzyme der Klasse III sind ACS/CODHs, sie unterscheiden sich jedoch im Aufbau von den Klasse I Enzymen. Da bei ihnen zwei getrennte Komplexe ($\alpha_2\beta_2$ und $\delta\gamma$) vorliegen. Die ϵ -Untereinheit fehlt ihnen. Klasse III Enzyme kommen außer bei Sulfatreduzierern auch bei homoacetogenen Bakterien vor (Lindahl 2002).

Klasse IV Enzyme sind Homodimere (α_2). Sie sind nur zur reversiblen Oxidation von Kohlenmonoxid in der Lage. Klasse IV Enzyme werden bei Kohlenmonoxid verwertenden Bakterien wie z.B. *Rhodospirillum rubrum* gefunden (Lindahl 2002).

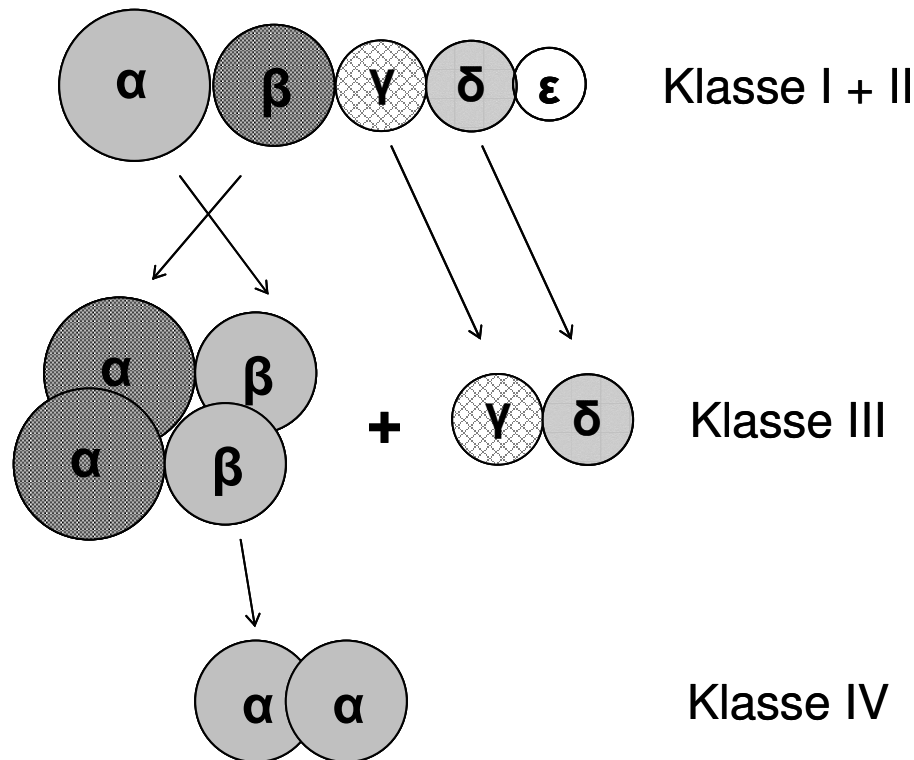


Abbildung 1.7 Verschiedene Klassen von CODHs und deren Zusammensetzung (verändert nach Lindahl, 2002). Einander homologe Untereinheiten sind in gleichen Grautönen gezeigt. Die Pfeile deuten die Homologieverhältnisse zusätzlich an. Klasse I/II-Enzyme sind ACS/CODHs aus fünf Untereinheiten, die α -Untereinheit ist die katalytische Untereinheit der CODH. Sie ist homolog zur β -Untereinheit der Klasse III Enzyme, die hier die katalytische Untereinheit ist, während die α -Untereinheit der Klasse III Enzyme homolog zur β -Untereinheit der Klasse I/II Enzyme ist. Die Corrinoid/FeS-Untereinheiten (γ, δ) liegen bei Klasse III Enzymen, im Gegensatz zu den Klasse I/II Enzymen, in einem getrennten Proteinkomplex vor.

Für mehrere Organismen liegen bereits Kristallstrukturen vor: so z.B. für die ACS/CODH aus *Moorella thermoacetica* (Doukov et al. 2002) oder die CODH aus *Rhodospirillum rubrum* (Drennan et al. 2001). Die katalytische Untereinheit (β) der ACS/CODH liegt als Dimer (β_2) im Zentrum des Komplexes und ist verantwortlich für die reversible Konversion von Kohlenmonoxid zu Kohlendioxid. Die Katalyse findet mit Hilfe von verschiedenen Metallclustern statt. Am Metallcluster der α -Untereinheit findet dann die Acetyl-CoA-Synthese bzw. Spaltung statt (Doukov et al. 2002).

1.2.4.5 Abbauwege ausgewählter Substrate

Abbildung 1.8 gibt einen schematischen Überblick über mögliche Abbauwege für einige typische Wachstumssubstrate von Sulfatreduzieren. Die Alkohole Ethanol, 1-Propanol und 1-Butanol werden zunächst durch Alkohol- bzw. Aldehyd-Dehydrogenasen zu den entsprechenden Aldehyden bzw. Säuren oxidiert. Im Falle von Ethanol ist das Oxidationsprodukt Acetat, welches dann entweder endoxidiert oder, bei unvollständigen Oxidierern, ausgeschieden wird. Butyrat (Oxidationsprodukt von 1-Butanol) kann nach Aktivierung zu Butyryl-CoA durch β -Oxidation von Fettsäuren ebenfalls zu zwei Molekülen Acetat abgebaut werden. Bei Propionat ist eine direkte Bildung von Acetat nicht möglich. Propionyl-CoA wird in einer Reaktionssequenz über Methylmalonyl-CoA, Succinyl-CoA, Succinat, Fumarat und Malat zunächst zu Oxalacetat umgewandelt. Oxalacetat wird dann zu Pyruvat decarboxyliert. Dieses kann dann, durch eine Pyruvat-Akzeptor-Oxidoreduktase, weiter zu Acetat oxidiert und decarboxyliert werden. Zentrale Enzyme, die an diesem Stoffwechselweg beteiligt sind, sind die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase und -Mutase. Erstere katalysiert eine Transcarboxylierung durch die Methylmalonyl-CoA aus Propionyl-CoA gebildet wird, letztere wandelt diese Verbindung durch Rearrangement des C-Skeletts zu Succinyl-CoA um. Die Methylmalonyl-CoA-Mutase ist ein Adenosyl-Cobalamin abhängiges Enzym, das ubiquitär verbreitet ist. Es ist bekannt, dass die Reaktion über einen radikalischen Mechanismus erfolgt, wobei ein hoch konserviertes Tyrosin eine tragende Rolle spielt und die Stereospezifität der Reaktion bestimmt (Miyamoto et al. 2003). Der genaue Mechanismus der Umwandlung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA ist jedoch noch nicht geklärt. Die Hauptaufgabe des Enzyms besteht hier möglicherweise in der Stabilisierung des Substrats in der korrekten Position (Mancia et al. 1999). Die restlichen Reaktionen entsprechen denen des Citratzyklus und werden von den entsprechenden Enzymen katalysiert. Der Abbau von Laktat wird von einer Laktat-Dehydrogenase katalysiert, die Laktat zu Pyruvat oxidiert.

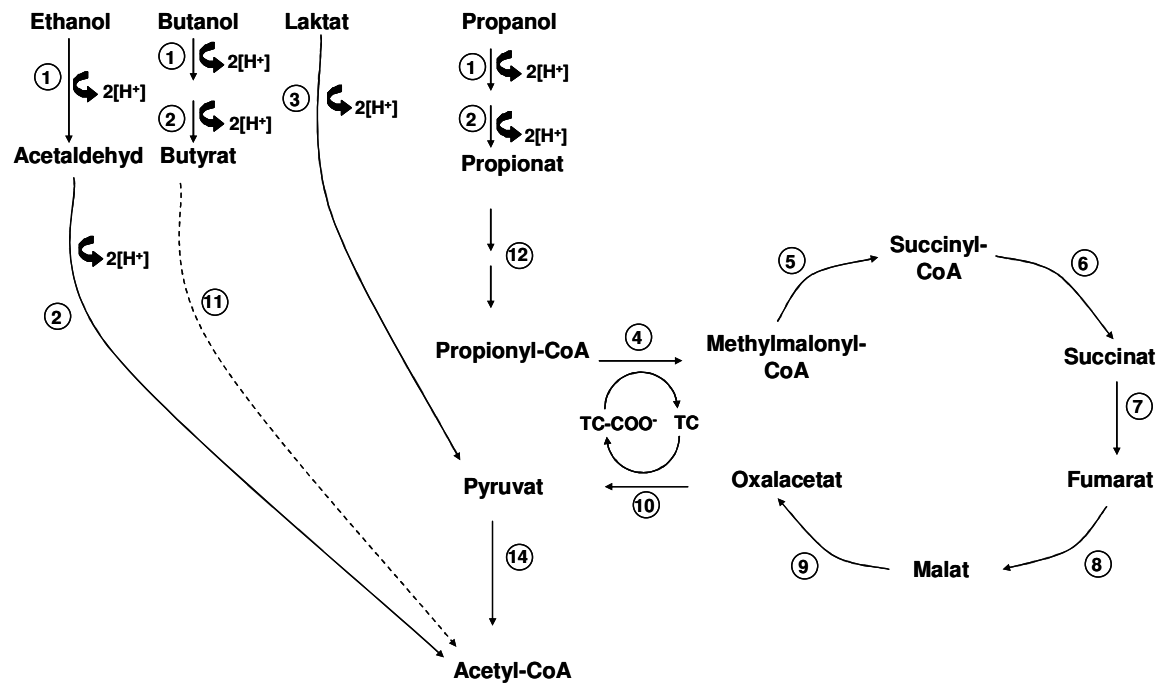


Abbildung 1.8 Übersichtsschema über den Abbau von Laktat, Ethanol, Propanol und Butanol. 1: Alkohol-Dehydrogenase, 2: Aldehyd-Dehydrogenase, 3: Laktat-Dehydrogenase, 4: Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase, 5: Methylmalonyl-CoA-Mutase, 6: Succinyl-CoA-Synthase, 7: Succinat-Dehydrogenase, 8: Fumarat-Dehydrogenase, 9: Malat-Dehydrogenase, 10: Pyruvat-Carboxylase, 11: β -Oxidation der Fettsäuren, 14: Pyruvat-Synthase

Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) lassen sich in drei Klassen einteilen (Reid und Fewson 1994): (i) NAD(P)-abhängige ADHs, (ii) NAD(P)-unabhängige ADHs, die Pyrroloquinolinquinon oder F_{420} als Cofaktor nutzen; und (iii) FAD-abhängige ADHs. Die NAD(P)-abhängigen ADHs wiederum können in drei Unterklassen unterteilt werden: erstens die zinkabhängigen, langkettigen ADHs (Gruppe I); zweitens die zinkabhängigen, kurzkettigen ADHs (Gruppe II); und drittens die eisenabhängigen ADHs (Gruppe III). Das erste bekannte Enzym dieser dritten Unterklasse ist die ADHII von *Zymomonas mobilis*. Von dieser letzten Klasse konnten bisher nur Vertreter bei Hefen oder Bakterien gefunden werden. Alkohol-Dehydrogenasen katalysieren entweder die Oxidation des Alkohols zum Aldehyd und spielen somit bei der Nutzung von Alkoholen als Substrat- oder Energiequelle eine Rolle oder sie katalysieren die Reduktion vom Aldehyd zum Alkohol, wie sie bei fermentativen Prozessen vorkommt (Reid und Fewson 1994). Bei Sulfatreduzierern wurden bisher zwei Alkohol-Dehydrogenasen aufgereinigt, die sich den eisenabhängigen bzw. Gruppe III ADHs zuordnen lassen (Hensgens et al. 1993, 1995).

1.2.5 Kälteanpassung

Große Teile der Erde und des Wasserkörpers sind permanent oder teilweise kalt. Die in diesen Habitaten verbreiteten psychrophilen oder psychrotoleranten Mikroorganismen sind durch verschiedene Modifikationen an tiefe Temperaturen angepasst. Eine wichtige und gut untersuchte Anpassung ist die Veränderung der Lipidzusammensetzung der Membranen. Die Funktionalität von Zellmembranen hängt im Wesentlichen von ihrer Fluidität ab. Diese nimmt jedoch mit fallenden Temperaturen ab, bis die Lipiddoppelschicht schließlich in einen gelartigen Zustand („solid phase“) übergeht („phase transition“) und damit die Membranfunktion nicht mehr aufrechterhalten kann (Nedwell 1999). Durch einen erhöhten Anteil an ungesättigten und kurzen Fettsäuren kann die Membranfluidität erhöht werden. Der Anteil an verzweigten Fettsäuren nimmt hingegen ab. Mikroorganismen sind in der Lage die Zusammensetzung der Zellmembranen als Antwort auf kalte Temperaturen zu verändern. Ungesättigte Fettsäuren werden dabei entweder *de novo* synthetisiert oder gesättigte Fettsäuren werden nachträglich durch Desaturasen desaturiert (Russel 1990). Auch bei SRB wurde die Lipidzusammensetzung der Zellmembranen für verschiedene mesophile und psychrophile Organismen untersucht. Insbesondere die untersuchten psychrophilen SRB zeichnen sich durch einen deutlich höheren Anteil an ungesättigten und kurzkettigen Fettsäuren aus (Könneke und Widdel 2003).

Eine verminderte Temperatur hat auch Auswirkungen auf Proteinstruktur und Proteinfunktion. So haben kälteangepasste Enzyme häufig eine höhere spezifische Aktivität bei tiefen Temperaturen, aber eine höhere Thermosensitivität, als ihre mesophilen Gegenstücke. Man geht davon aus, dass diese Eigenschaften ihren Grund in der höheren Flexibilität kälteangepasster Proteine haben (Gerday et al. 1997). Bei kälteadaptierten Archaeen hat man festgestellt, dass ihre Proteine mehr Glutamin, Threonin und hydrophobe Aminosäuren enthalten. Anhand der Genomsequenz von *Desulfotalea psychrophila* konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (Rabus et al. 2004). Ein weiterer Faktor ist die Flexibilität von Nukleinsäuren, die bei tieferen Temperaturen abnimmt. Die Effizienzen von Transkription, Translation und DNA-Replikation werden dadurch negativ beeinflusst. Deshalb sind sogenannte „Kälteschockproteine“ (Cold Shock Protein: CSP) oder „Kälteanpassungsproteine“ (Cold Acclimation Protein: CAP) häufig auch DNA oder RNA Chaperone, die dies ausgleichen (Phadtare et al. 1999). Mesophile Organismen wie z.B. *E. coli* reagieren auf einen plötzlichen Temperaturabfall in der Regel mit einem

Kälteschock. Dieser äußert sich in einem Aussetzen des Wachstums, einer hohen Induktion von CSPs und einer verminderten Expression der Haushaltsgene. Nach einer Übergangsphase setzt das Wachstum wieder ein, die Bildung der CSPs geht wieder zurück (Panoff et al. 1998). Es gibt aber auch eine Reihe von Organismen, die in der Lage sind, sich ohne diese gesonderte Synthesephase an kalte Temperaturen anzupassen (Panoff et al. 1997; Colucci und Innis 1996). CAPs zeichnen sich dadurch aus, dass sie bei kalten Temperaturen induziert werden, ihre Synthese aber, im Gegensatz zu der der CSPs, anhält, um dauerhaft Wachstum bei tiefen Temperaturen zu gewährleisten (Panoff et al. 1998). Auch bei psychophilen Organismen konnte eine gesteigerte Expression von CSPs und CAPs nachgewiesen werden (Colucci und Inniss 1996; Berger et al. 1996). Es werden hier teilweise sogar mehr CSPs bzw. CAPs gebildet, als bei mesophilen Organismen. Man geht davon aus, dass die Kälteschockantwort mesophiler Organismen unvollständig ist, weshalb ihnen ein effektives Wachstum bei tiefen Temperaturen nicht möglich ist (Berger et al. 1996).

1.3 Untersuchte Bakterienstämme

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei Stämme sulfatreduzierender Bakterien untersucht: *Desulfobacterium autotrophicum*, *Desulfotalea psychrophila* und *Desulfovibrio vulgaris*. Diese drei Stämme unterscheiden sich in grundlegenden physiologischen Eigenschaften und repräsentieren somit unterschiedliche Strategien für ihre Anpassung an die Umwelt.

1.3.1 *Desulfovibrio vulgaris*

Dv. vulgaris ist ein mesophiles Bakterium mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 37°C. Die Zellen sind bewegliche Vibrionen. Verglichen mit anderen SRB ist das Spektrum verwertbarer Substrate eher eng: Laktat, Pyruvat, Formiat und einfache Alkohole werden unvollständig zu Acetat oxidiert. *Dv. vulgaris* kommt in Süßwasser, marinen Habitaten und Brackwasserhabitaten vor (Postgate und Campell 1966). Bakterien der Gattung *Desulfovibrio* gehören zu den am besten untersuchten Sulfatreduzierern. Das Genom von *Desulfovibrio vulgaris* (Stamm Hildenborough) wurde vollständig sequenziert (Heidelberg et al. 2004), die annotierten Genomdaten sind öffentlich zugänglich (<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=gdv>).

1.3.2 *Desulfotalea psychrophila*

Dt. psychrophila ist ein Sulfatreduzierer, der aus einem permanent kalten, arktischen Sediment vor der Küste von Svalbard (Spitzbergen) isoliert wurde (Knoblauch et al. 1999). Es handelt sich um stäbchenförmige Zellen. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 10°C, Wachstum ist jedoch bis zu einer Temperatur von -1,8°C möglich. Phylogenetisch gehört dieses Bakterium zu den Deltaproteobacteria und wird dem Genus *Desulfotalea* zugeordnet. *Dt. psychrophila* ist nicht in der Lage die verwerteten Substrate vollständig zu CO₂ zu oxidieren. Es wächst sehr gut mit Substraten wie Laktat, Pyruvat, Alkohol und Wasserstoff. Diese Substrate sind auch für *Desulfovibrio* typisch. *Dt. psychrophila* ist auch in der Lage fermentativ mit Pyruvat und Fumarat zu wachsen. Neben den für Sulfatreduzierer sehr typischen Elektronenakzeptoren wie Sulfat, Thiosulfat und Sulfit, ist *Dt. psychrophila* in der Lage Eisen(III), falls es in der Form von Eisen(III)-Citrat vorliegt, als Elektronenakzeptor zu nutzen. Im Rahmen des REGX Projekts wurde *Dt. psychrophila* vollständig sequenziert (Rabus et al. 2004). Eine besondere genetische Ausstattung, die die Psychrophilie ermöglicht, konnte jedoch nicht identifiziert werden. Eine Besonderheit stellt jedoch die Abwesenheit von *c*-Typ Cytochromen dar.

1.3.3 *Desulfobacterium autotrophicum*

Db. autotrophicum wurde aus einem marinen Sediment im Mittelmeer isoliert (Brysch et al. 1987). Die Zellen von *Db. autotrophicum* sind oval und beweglich. Phylogenetisch sind sie ebenfalls den Deltaproteobacteria zuzuordnen. Physiologisch gehört *Db. autotrophicum* zu den vielseitigen Sulfatreduzierern. Wachstum ist mit Substraten wie Pyruvat, Laktat, Alkoholen und Fettsäuren (bis zu C14) möglich. Der Organismus ist, im Gegensatz zu den zuvor genannten, zur vollständigen Oxidation organischer Substrate fähig, sowie zu chemolithoautotrophem Wachstum mit Wasserstoff und CO₂. Zur terminalen Oxidation von Acetat wird der C1-Weg genutzt (Schauder et al. 1986). Laktat, Pyruvat, Fumarat und Malat können in Abwesenheit von Elektronenakzeptoren fermentiert werden. Als alternativer Elektronenakzeptor kann Thiosulfat genutzt werden. Obwohl die optimale Wachstumstemperatur von *Db. autotrophicum* bei 28°C liegt, ist auch ein Wachstum bei tieferen Temperaturen (bis zu 0°C) möglich und der Organismus wird somit als psychrotolerant eingeordnet (Rabus et al. 2002). Im Rahmen des REGX Projekts wird der Organismus zum gegenwärtigen Zeitpunkt sequenziert, die Teilsequenzen waren im

Rahmen der vorliegenden Arbeit auf einem BLAST Server (<http://www.regx.de>) zugänglich.

1.4 Stand der Genomforschung bei sulfatreduzierenden Bakterien

Im Jahre 1995 wurde das erste bakterielle Genom (*Haemophilus influenzae*) veröffentlicht. Seitdem nimmt die Anzahl der sequenzierten Genome exponentiell zu. Waren zu Beginn der bakteriellen Genomforschung häufig pathogene Organismen Gegenstand von Sequenzierungsprojekten, lag im Jahr 2000 der Anteil der Genomprojekte von nichtpathogenen Mikroorganismen bereits bei 50% (Nelson et al. 2000). Neben dem besseren Verständnis von Organismen, die in Industrie und Umweltschutz vielfältiges Anwendungspotential bieten, kommt auch ökologischen Fragestellungen eine immer größere Bedeutung zu.

1.4.1 Von der DNA zur Vorhersage der Genfunktion

Die zurzeit am häufigsten angewandte Strategie zur Sequenzierung von bakteriellen Genomen, ist die „Shot gun“ Sequenzierung (Abbildung 1.9). Bei der „Shot gun“ Strategie wird die genomische DNA zunächst fragmentiert. Dies kann entweder physikalisch, z.B. durch Ultraschall geschehen oder mit enzymatischen Methoden (verdaut mit DNase oder Restriktionsenzymen). Die gewonnenen Fragmente werden dann kloniert, so dass eine Klonbibliothek mit 1-2 kB großen Integraten entsteht, wobei jeder Vektor nur ein genomisches Fragment enthalten und die Gesamtzahl aller klonierten Fragmente das gesamte Genom abdecken sollte. Dann wird eine große Anzahl von zufällig ausgewählten Klonen sequenziert. Damit ist die „Shot gun“ Phase der Sequenzierung abgeschlossen. In der Regel ist das Genom dann zu 90 – 95% sequenziert (Sterky und Lundeberg 2000). Die erhaltenen Sequenzen werden dann assembliert, d.h. es wird nach Überlappungen gesucht, um Consensussequenzen (Contigs) zu erstellen. In der nachfolgenden Phase werden die Contigs geordnet, entweder durch die Sequenzierung sogenannter „linking clones“ oder durch die Analyse kodierender Sequenzen an den Enden der Contigs. Die dann noch vorhandenen Lücken werden z.B. durch „Genome Walking“, d.h. durch die direkte Sequenzierung genomischer DNA, geschlossen. Die Generierung von Primern erfolgt hierbei mit Hilfe der Contigs bzw. der erhaltenen Sequenzen (Frangeul et al. 1999).

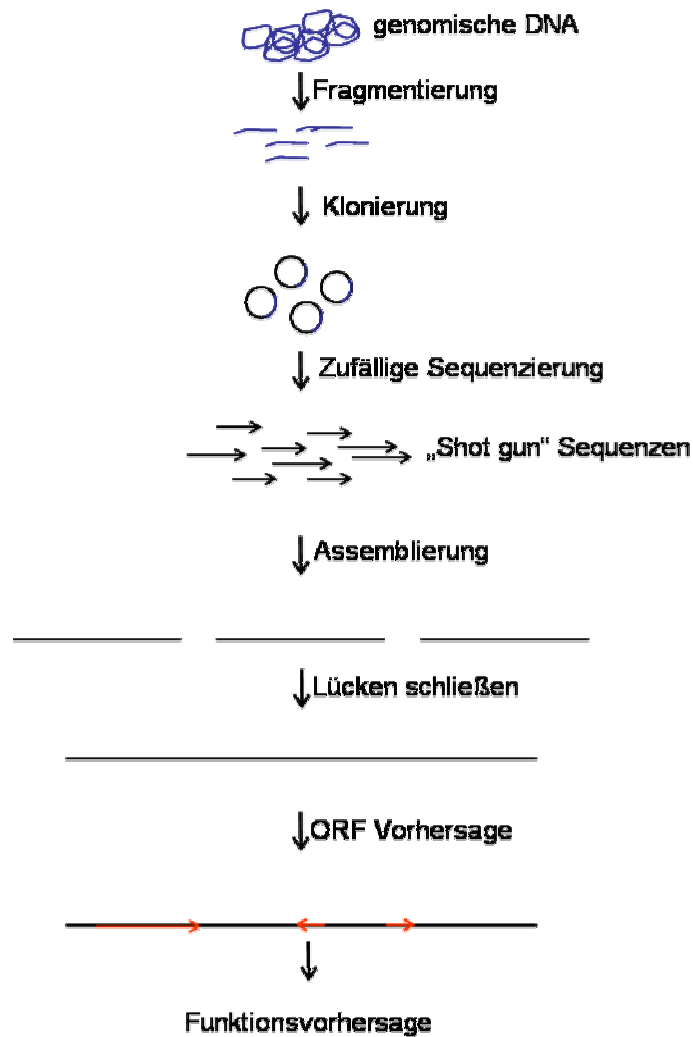


Abbildung 1.9 Genomsequenzierung bei Bakterien. Genomische DNA wird fragmentiert, die Fragmente werden kloniert, die Klone der so erhaltenen Klonbibliothek werden in zufälliger Reihenfolge sequenziert. Nach der Anordnung (Assemblierung) dieser Sequenzen erhält man Contigs, die Lücken zwischen diesen werden durch verschiedene Ansätze geschlossen. Das lineare Genom kann nun annotiert werden, d.h ORFs und mögliche Genfunktionen werden so weit wie möglich vorhergesagt.

Ist man schließlich zu einer durchgehenden Sequenz gelangt, erfolgt die Phase der Genom-Annotation. Zunächst werden die offenen Leserahmen (ORFs) mit Hilfe spezieller Computerprogramme vorhergesagt. Dann erfolgt eine Funktionszuweisung zu diesen vorhergesagten ORFs. Auch dies geschieht zunächst automatisiert, indem die Nukleotid- und die Proteinsequenzen der vorhergesagten ORFs durch „BLAST Search“ (Altschul et al. 1990) und andere Methoden mit Datenbanken verglichen werden. Bei signifikanten Übereinstimmungen erfolgt eine zunächst automatische Funktionszuweisung, die

allerdings noch einmal überprüft werden muss. Letzteres nennt man Feinannotation. Das so erhaltene Genom bietet eine Fülle an Informationen und bildet die Grundlage für die funktionale Genomforschung (siehe Abschnitt 1.5).

1.4.2 Genomprojekte mit Sulfatreduzierern

Bei Anfertigung der vorliegenden Arbeit waren drei Sulfatreduzierer vollständig sequenziert und annotiert: *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk et al. 1997), *Desulfovibrio vulgaris* (Heidelberg et al. 2004), und *Desulfotalea psychrophila* (Rabus et al. 2004). *A. fulgidus* ist ein hyperthermophiles Archeon, während *Dv. vulgaris* und *Dt. psychrophila* zu den Deltaproteobacteria gehören. Die Genome der sulfatreduzierenden Bakterien *Desulfobacterium autotrophicum* und *Desulfovibrio desulfuricans*, sind noch in Arbeit.

Tabelle 1.1 gibt einen vergleichenden Überblick über die wichtigsten Eigenschaften der drei vollständig sequenzierten Sulfatreduzierer. *A. fulgidus* hat das kleinste Genom. Dementsprechend sind weniger ORFs vorhergesagt und die Anzahl der ORFs mit einer Funktionszuweisung geringer ist. Allerdings hat dieser Organismus die höchste Gendichte mit 92,2% kodierenden Sequenzen bezogen auf die Gesamtsequenz des Genoms. Die entsprechenden Werte für *Dv. vulgaris* und *Dt. psychrophila* sind sich mit 86,4% bzw. 86,6% recht ähnlich. Auch im Hinblick auf Genomgröße und Anzahl vorhergesagter ORFs, sind diese beiden einander am ähnlichsten. Der GC-Gehalt ist mit 63,2% bei *Dv. vulgaris* am höchsten; 48,5% bzw. 46,6% bei *A. fulgidus* und *Dt. psychrophila* ist als ein ungewöhnlicher Befund anzusehen, da sich die optimalen Wachstumstemperaturen (10°C und 80°C) gerade dieser beiden Organismen deutlich unterscheiden.

Tabelle 1.1 Allgemeine Genomeigenschaften von *Archaeoglobus fulgidus*, *Desulfovibrio vulgaris* und *Desulfotalea psychrophila*

	<i>A. fulgidus</i>	<i>Dv. vulgaris</i>	<i>Dt. psychrophila</i>
Genomgröße [bp] (Chromosom)	2.178.400 bp	3.570.858 bp	3.523.383
Plasmide [bp]	-	202.301	121.586 14.663
Kodierend	92,2%	86,4%	86,6%
GC-Gehalt	48,5%	63,2%	46,8%
ORFs (gesamt)	2436	3395	3118
Funktionszuweisung	1096	1894	1545

Da es sich bei allen drei Organismen um Sulfatreduzierer handelt, ist ihnen natürlich auch die genetische Ausstattung, die zur dissimilatorischen Reduktion von Sulfat benötigt wird, gemeinsam. Darüber hinaus gibt es überraschend wenig Gemeinsamkeiten auf genomischer Ebene (Rabus et al. 2004). Eine Besonderheit stellt die Abwesenheit von *c*-Typ Cytochromen bei *Dt. psychrophila* dar. Da in der vorliegenden Arbeit auch die drei genannten Organismen mit *Db. autotrophicum* im Hinblick auf ihre genetische Ausstattung verglichen wurden, wird dieses Thema an anderer Stelle ausführlich behandelt (siehe Kapitel 4.5).

1.5 Strategien der funktionalen Genomforschung

Die immer weiter voranschreitende Sequenzierung verschiedenster mikrobieller Genome führt zur Anhäufung großer Datenmengen. Jedoch konnte für einen erheblichen Teil der ORFs keine Funktionsvorhersage getroffen werden. Transkriptomik und Proteomik sind häufig gewählte Ansätze der funktionalen Genomforschung, um erste Hinweise auf die Funktion dieser unbekanntem Gene zu erhalten.

1.5.1 Transkriptomik

Eine wichtige Technik ist der DNA-Microarray, der es ermöglicht das gesamte Transkriptom, d.h. die Gesamtheit aller mRNAs, die zu einem bestimmten Zeitpunkt gebildet werden, zu erfassen. Die wichtigsten beiden DNA-Microarray Methoden basieren

auf PCR Produkten oder synthetisierten Oligonukleotiden. In beiden Fällen kann dabei das gesamte Genom des untersuchten Organismus oder eine bestimmte Auswahl an Genen auf dem Array repräsentiert werden. Hybridisiert werden diese DNA-Microarrays entweder mit fluoreszenzmarkierter cDNA oder RNA, wobei zwei verschieden markierte cDNA Populationen gleichzeitig eingesetzt werden. Da diese Populationen unterschiedlichen physiologischen Zuständen entsprechen, können Expressionsunterschiede einem bestimmten physiologischen Zustand zugeordnet werden (Ye et al. 2001).

Zur Erzeugung von Fluoreszenzsignalen gibt es derzeit verschiedene Möglichkeiten. Die wichtigsten sind in Abbildung 1.10 schematisch dargestellt. Eine der einfachsten Methoden ist die Anfärbung der DNA mit „SybrGreen“, ein Fluoreszenzfarbstoff, der an doppelsträngige Nukleinsäuren bindet. Erst dann wird ein ausreichend hohes Signal detektiert. In freiem Zustand zeigt der Farbstoff dagegen wenig Fluoreszenz. Diese Methode hat allerdings den Nachteil, dass auch Nebenprodukte der PCR detektiert werden (Bustin 2000). Um diese Problematik zu umgehen, existieren weitere Methoden. Bei der „Taqman“ Chemie, wird eine sequenzspezifische Sonde generiert, die an beiden Enden eine Fluoreszenzfarbstoff trägt. So lange beide Farbstoffmoleküle an die Hybridisierungssonde gebunden sind, wird das erzeugte Fluoreszenzsignal durch Fluoreszenzresonanz Energietransfer (FRET) gedämpft. Erst durch die 5'-Nukleaseaktivität der DNA Polymerase wird der Farbstoff freigesetzt und kann die Fluoreszenz ungehindert abgeben (Bustin 2000). Der „Molecular Beacon“ Ansatz funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip. Hier ist die Hybridisierungssonde so konzipiert, dass die Enden, die den Farbstoff tragen, durch Hybridisierung mit sich selbst in räumliche Nähe gebracht werden und so das Signal gedämpft wird. Bindet die Hybridisierungssonde an das Zielgen ist dies nicht mehr der Fall und das Signal kann detektiert werden (Bustin 2000). Die neueste Technik ist „Scorpion“. Dabei trägt ein sequenzspezifischer Primer eine Haarnadelstruktur mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem „Quencher“. Diese Struktur ist durch einen „PCR Stopper“, der das Ablesen der Haarnadelstruktur verhindert, mit dem 5'-Ende des Primers verbunden. Die Haarnadelstruktur wird so Teil des neu gebildeten PCR Produkts und bei der Hitzedenaturierung im folgenden Zyklus werden „Quencher“ und Fluorophor getrennt. Das Ende des „Scorpion“ hybridisiert dann mit der Zielsequenz im neu gebildeten PCR-Produkt, wobei die räumliche Trennung zwischen „Quencher“ und Fluorophor erhalten bleibt. Das Fluoreszenzsignal kann ungehindert detektiert werden (Bustin 2002).

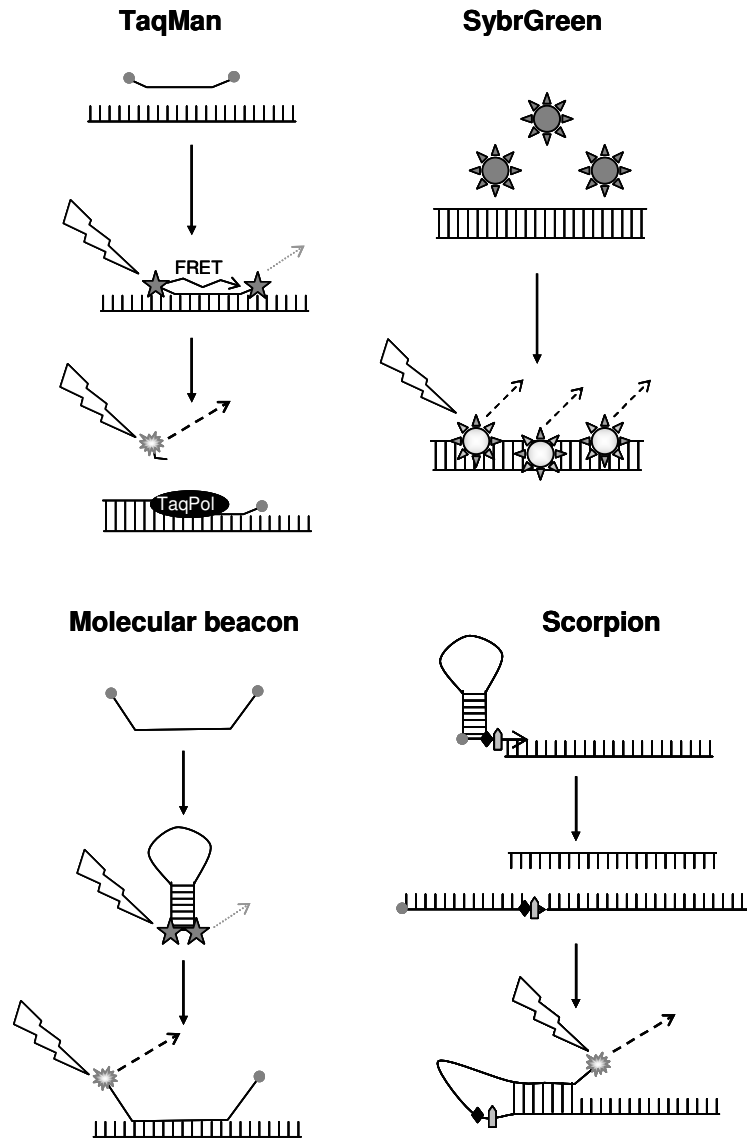


Abbildung 1.10 „Real-Time RT-PCR“ Methoden zur Erzeugung eines Fluoreszenzsignals. Erklärung: siehe Text.

Ein gezielterer experimenteller Ansatz ist die Real-Time RT-PCR. Hier wird nicht das Transkriptom als Ganzes, sondern einzelne Gene im Hinblick auf ihre Regulation betrachtet. Die mRNA wird zunächst mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, welche durch PCR exponentiell amplifiziert wird. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge der PCR Produkte, bis schließlich eine Sättigung erreicht wird. Die Menge der Produkte ist während der exponentiellen Phase proportional zur Menge an Ausgangsmaterial (Ginzinger 2002). Die Produktmenge kann mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen nach jedem Zyklus bestimmt werden.

1.5.2 Proteomik

Als Proteom bezeichnet man die Gesamtheit aller Proteine, die ein Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen bildet. Eine zentrale Technik zur Untersuchung eines Proteoms ist die zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE). Abbildung 1.11 zeigt den Verlauf eines typischen 2DE-Experiments.

Ausgangsmaterial ist die biologische Probe, z.B. Zellmaterial aus einer unter definierten Bedingungen angezogenen Bakterienkultur. Durch einen Zellaufschluss in Detergenzien-haltigem Puffer werden die Proteine solubilisiert. Eine definierte Menge dieses Proteinextrakts wird dann zur isoelektrischen Fokussierung (erste Dimension) eingesetzt. Dieses Trennverfahren basiert auf der pH-Abhängigkeit der Nettoladung von Proteinen. Der isoelektrische Punkt eines Proteins ist als der pH-Wert definiert, bei dem die Nettoladung eines Proteins null ist. Legt man nun an einen pH-Gradienten ein elektrisches Feld an, so wandern die Proteine entsprechend ihrer Ladung bis zu ihrem isoelektrischen Punkt. Anschließend werden die Proteine durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) gemäß ihrer Molekularmasse aufgetrennt (zweite Dimension). Die denaturierten Proteine sind durch SDS negativ geladen. Die Wanderungsgeschwindigkeit durch die Polyacrylamidmatrix im elektrischen Feld wird dabei durch die Porengröße bestimmt, d.h. größere Moleküle wandern langsamer als kleinere. Durch Kombination dieser beiden Trennprinzipien ist die 2DE das hochauflösendste Verfahren zur Separierung hoch komplexer Proteingemische. In einem einzelnen 2DE Gel (20 × 30 cm) können mehrere tausend Proteine getrennt werden.

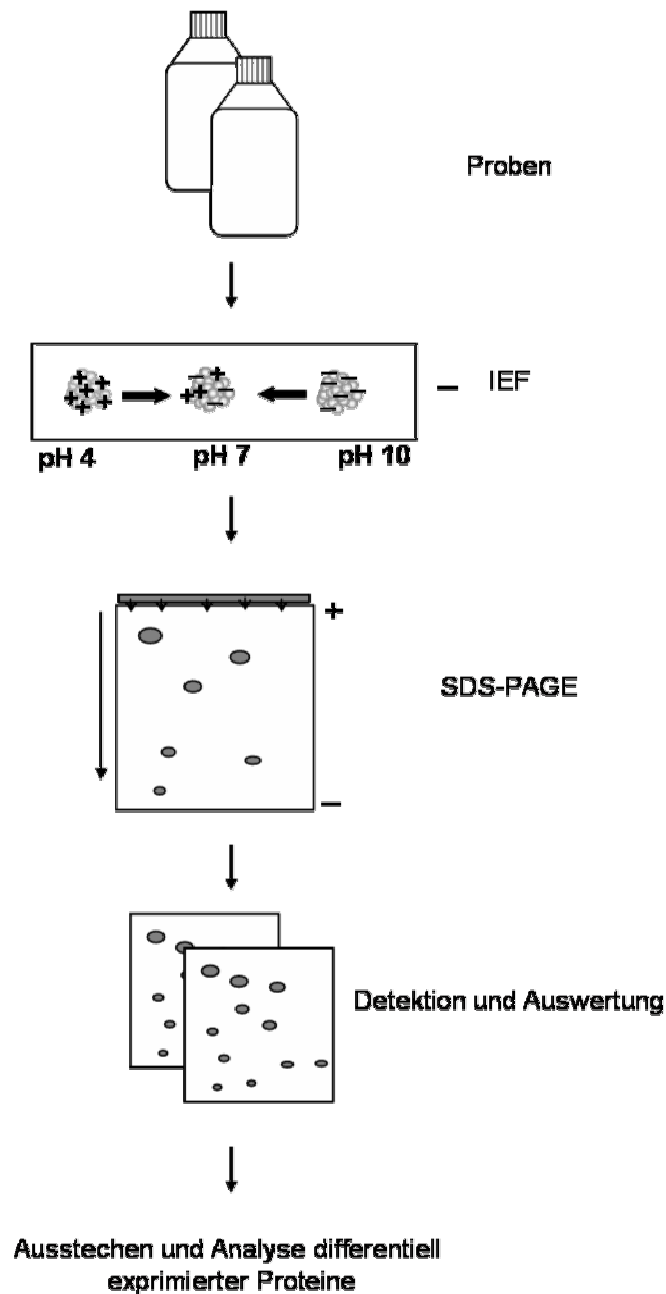


Abbildung 1.11 Zweidimensionale Gelelektrophorese. Nach dem Probenaufschluß werden die Proteine der Zellextrakte isoelektrisch fokussiert (1. Dimension). Im Anschluß daran folgt eine Auftrennung nach Molekülgröße mittels SDS-PAGE (2. Dimension). Nach der Färbung und Auswertung können differentiell gebildete Proteine ausgestochen und identifiziert werden.

Zur Visualisierung der separierten Proteine sind verschiedene Methoden verfügbar. Tabelle 1.2 fasst die wesentlichen Eigenschaften der verschiedenen Färbungen zusammen.

Tabelle 1.2 Vergleich verschiedener Färbemethoden (verändert nach Gade et al. 2003); MS: Massenspektrometrie

Färbung	Detektionsgrenze [ng]	Linearer Bereich (Größenordnung)	MS kompatibel
Coomassie	5 - 10	1	+
Coomassie(kolloidal)	30 - 100	1	+
Silber	0,05 - 2	1	(+) ^a
SYPRO™ Ruby	1 - 2	4	+

a) Spezialprotokoll erforderlich

Die Färbung der Proteine mit Silbernitrat ist sehr sensitiv, eignet sich jedoch aufgrund des geringen dynamischen Bereichs nicht zur Quantifizierung. Dies kann man seit kurzem mit fluoreszenzbasierten Methoden, wie z.B. SYPRO™ Ruby erreichen. Hier ist die Färbung über einen Bereich von vier Größenordnungen linear d.h. dass die Signalintensität direkt proportional zur Proteinmenge ist. Sollen die Proteine anschließend mittels chemischer Analyse identifiziert werden, wird bevorzugt mit Coomassie gefärbt, da dieser Farbstoff im Gegensatz zu Silber nicht bei der Edmann-Sequenzierung oder bei der Massenspektrometrie (MS) stört.

Durch Vergleich von Gelbildern verschiedener physiologischer Zustände, z. B. verschiedenen Wachstumsbedingungen, können differenziell gebildete Proteine detektiert werden. In ihrer Gesamtheit bilden sie das differenzielle Proteom.

Zur Identifizierung von detektierten Proteinen werden zur Zeit hauptsächlich zwei Methoden eingesetzt. Zum einen die direkte Bestimmung N-terminaler Sequenzen durch Edmann-Abbau, und zum anderen der Peptidmassenfingerprint (PMF). Durch Edmann-Sequenzierung lassen sich Aminosäuressequenzen von 10 – 30 Aminosäuren ermitteln. Durch Abgleich mit Sequenzen öffentlicher Datenbanken gelangt man zum kodierenden Gen. Das Funktionsprinzip des PMF ist in Abbildung 1.12 genauer erläutert. Zunächst werden die ausgestochenen Proteine tryptisch verdaut und die Massen der so erhaltenen Peptide über MALDI-TOF MS bestimmt. Diese Peptidmassenliste ist charakteristisch für jedes Protein. Man nennt dieses Muster einen Peptidmassen „Fingerprint“ (PMF). Gendatenbanken, insbesondere von Genomen, bilden die Grundlage für die nachfolgende Identifizierung. Vorhergesagte ORFs werden in Aminosäuresequenzen übersetzt und es

werden alle theoretisch möglichen Peptide eines tryptischen Verdau mit ihren Massen berechnet. Für jeden ORF erhält man so einen theoretischen PMF. Durch Abgleich des experimentell bestimmten PMF gegen diesen Datensatz lässt sich der ORF, der für das analysierte Protein kodiert, identifizieren.

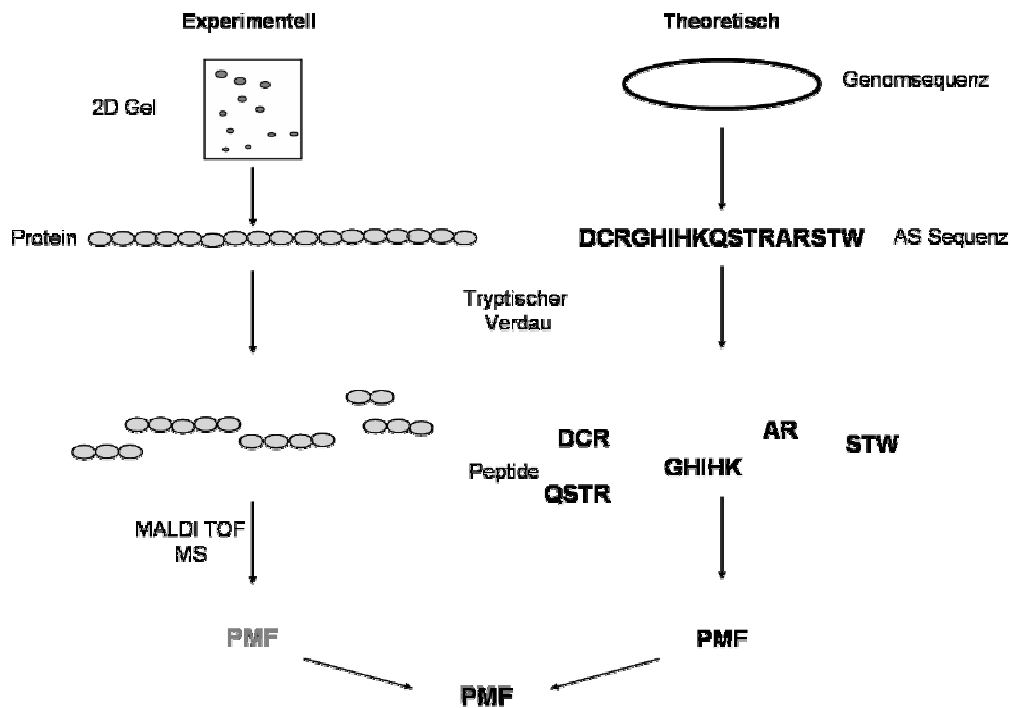


Abbildung 1.12 Proteinidentifizierung durch "Peptide Mass Fingerprint" (PMF). Zum einen wird der Peptidmassenfingerprint eines Proteins experimentell bestimmt, indem die Proteine tryptisch verdaut und dann die Massen der gebildeten Proteine massenspektrometrisch bestimmt werden. Zum anderen werden die tryptischen Fragmente und deren Massen der vorhergesagten ORFs des Genoms theoretisch berechnet. Gegen diesen Datensatz an theoretischen Fingerprints wird der experimentell bestimmte abgeglichen. So kann zu dem untersuchten Protein das kodierende Gen zugeordnet werden.

1.6 Bearbeitete Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Anpassung von SRB an unterschiedliche Kultivierungsbedingungen. Als Modellorganismus wurde vor allem *Desulfobacterium autotrophicum* untersucht, da sein Genom im Rahmen des REGX Projekts bestimmt wird.

(1) Kälteanpassung

Db. autotrophicum ist ein typischer Bewohner mariner Sedimente in gemäßigten Klimazonen. Diese können im Tages- wie Jahresgang großen Temperaturschwankungen unterliegen. Vorausgegangene wachstumsphysiologische Untersuchungen zeigten, dass *Db. autotrophicum* über ein breites Temperaturspektrum (-1 – 31°C) verfügt. Da ein Wachstum noch bei bzw. unterhalb von 0°C stattfindet, wurde der Organismus als psychrotolerant eingeordnet (Rabus et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob *Db. autotrophicum* auf tiefe Temperaturen mit einer grundsätzlichen Umstellung seines Stoffwechsels und *de novo* Synthese von Proteinen reagiert, wie dies von anderen mesophilen und psychrotoleranten Mikroorganismen bekannt ist. Als zentrale Methode für eine Analyse differenzieller Proteinbildung wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese eingesetzt.

(2) Abbau von Alkoholen

Db. autotrophicum verfügt über ein breites Spektrum von Wachstumssubstraten. Dazu zählen auch Gärungsendprodukte wie Alkohole oder Laktat, die bereits im Porenwasser mariner Sedimente nachgewiesen werden konnten. In der vorliegenden Arbeit sollte mit der Frage nach der Regulation der Verwertung dieser Substrate auf physiologischer (Anpassungsstudien), Protein (2DE) und RNA-Ebene (Real-Time RT-PCR) nachgegangen werden.

(3) Expressionsanalyse bei Genen der Methylmalonyl-CoA-Mutase

Die Expression des Gens der Methylmalonyl-CoA-Mutase von *Db. autotrophicum* wurde untersucht, da dieses Enzym eine zentrale Rolle beim Abbau von Propionat, einem Zwischenprodukt des Propanolabbaus, spielt. Die Expressionsstudien wurden von physiologischen Experimenten begleitet.

(4) CO-Dehydrogenase

Da in *Db. autotrophicum* die terminale Oxidation von Acetat über den C1-Weg erfolgt, wurde auch die Expression von vorhergesagten Genen der CODH untersucht. Darüber hinaus sollte die Regulation der CODH auch im Hinblick auf den Wechsel zwischen heterotrophem und autotrophem Wachstum untersucht werden.

(5) Metabolische Rekonstruktion auf Genomebene

Neben den regulatorischen Aspekten lag ein weiteres Ziel in der metabolischen Rekonstruktion auf Basis der vorliegenden Genomsequenz (noch nicht vollständig) von *Db. autotrophicum*. Die experimentell untersuchten Gene sollten dadurch in den metabolischen Gesamtzusammenhang eingebettet werden.

(6) Cytochromanalyse bei *Desulfotalea psychrophila*

Cytochrome spielen bei Sulfatreduzierern eine zentrale Rolle beim Elektronentransport und sind für viele Spezies experimentell belegt. Bei *Dt. psychrophila* konnten im Genom jedoch keine Gene für *c*-Typ Cytochrome nachgewiesen werden (Rabus et al. 2004). Um diese theoretische Erkenntnis experimentell zu belegen, wurden Differenzspektren zellfreier Extrakte von *Dt. psychrophila* aufgenommen. *Dv. vulgaris* und *Db. autotrophicum* dienten hierbei als Vergleichsorganismen. Außerdem wurde das Genom von *Dt. psychrophila* im Hinblick auf alternative Elektronentransportmoleküle, die die Funktion periplasmatischer *c*-Typ Cytochrome übernehmen könnten, untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Gase

Die für die mikrobiologischen Methoden und für die chemische Analyse verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad "zur Analyse" bzw. „reinst“ und wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

Chemikalien für die zweidimensionale Gelelektrophorese stammten von folgenden Firmen: Amersham Biosciences (Freiburg), Biomol (Hamburg), Biozym (Hessisch Oldendorf), Fluka (Buchs, Schweiz), Jürgens (Bremen), Merck (Darmstadt), Proteomic Solutions (St. Marcel, Frankreich).

Für molekularbiologische Methoden wurden Biochemikalien und Enzyme der folgenden Firmen verwendet: Ambion (Huntingdon, Großbritannien), Agilent (Paolo Alto, USA), Applied Biosystems (Weiterstadt), Biorad (München), Biozym (Hessisch Oldendorf), Eppendorf (Hamburg), Eurogentech (Seraing, Belgien), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Promega (Mannheim), QIAGEN (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen). Die für die RNA Analytik verwendeten Chemikalien waren als „RNase-frei“ zertifiziert.

Von der Firma Messer-Griesheim (Osterholz-Scharmbeck) wurden folgenden Gase bezogen: N₂ (99,999%), CO₂ (99,995%), N₂/CO₂ (90/10) und H₂/CO₂ (20/80).

2.2 Bakterienstämme:

Folgende Bakterienstämme wurden in dieser Arbeit verwendet:

Desulfobacterium autotrophicum Stamm HRM2: DSMZ3332

Desulfotalea psychrophila Stamm LSv54: DSM12343

Desulfovibrio vulgaris Stamm Hildenborough: DSM644

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Herstellung von Kulturmedien

Für die Anzucht der verwendeten anaeroben Bakterienstämme wurde anoxisches Medium unter Verwendung anaerober Kultivierungstechniken (Widdel und Bak 1992) hergestellt. Die Mineralsalzkomponenten des Mediums wurden in einem Spezialkolben mit Begasungsaufsatz autoklaviert und das Abkühlen des Mediums erfolgte unter N₂ Atmosphäre, um einen erneuten Eintrag von Luftsauerstoff zu vermeiden.

Die definierten Mineralmedien für *Desulfobacterium autotrophicum*, *Desulfovibrio vulgaris* und *Desulfotalea psychrophila* setzten sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 2.1 Zusammensetzung der Mineralmedien (g/l)

Substanz	<i>Db. autotrophicum</i>	<i>Dt. psychrophila</i>	<i>Dv. vulgaris</i>
Na ₂ SO ₄	3,00	4,00	4,00
KH ₂ PO ₄	0,20	0,20	0,20
NH ₄ Cl	0,30	0,25	0,30
NaCl	21,00	10,00	1,00
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	3,00	3,00	0,40
KCl	0,50	0,50	0,50
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,15	0,15	0,15

In der Regel wurden die Minerallösungen als zehnfaches Konzentrat angesetzt und dann entsprechend verdünnt.

Nach dem Abkühlen wurden die in Tabelle 2.2 aufgeführten Medienzusätze unter N₂/CO₂ Atmosphäre steril zugegeben.

Tabelle 2.2 Medienzusätze

Substanz	<i>Db.</i> <i>autotrophicum</i>	<i>Dt. psychrophila</i>	<i>Dv. vulgaris</i>
Selenit / Wolframatlsg.	1 ml	1 ml	1 ml
Spurenelemente (sauer)	1 ml	1 ml	—
Spurenelemente (komplex)	—	—	1 ml
Vitamingemisch	1 ml	1 ml	—
Vitamin B12	1 ml	1 ml	—
Riboflavin	1 ml	1 ml	—
Thiamin	1 ml	1 ml	—
NaHCO ₃ 1 mol/l	30 ml	30 ml	30 ml
Resazurin ^a	1 ml	1 ml	1 ml
Na-Dithionit	—	—	einige Körnchen
Sulfid ^a	1 ml	1 ml	1 ml

^a Zugabe erfolgte mit einer N₂ begasten Spritze

Vor dem Abfüllen wurde der pH-Wert auf 7,0 – 7,3 mit 2 N HCl eingestellt. Das Medium wurde entweder luftblasenfrei in 50 ml Rundhalsflaschen oder in 200 bzw. 400 ml Achteckflaschen abgefüllt. Beim Befüllen der Achteckflaschen wurde ein Drittel des Volumens mit N₂/CO₂ überschichtet und die Flaschen wurden mit Butylstopfen verschlossen.

2.3.2 Herstellung der Medienzusätze und Substrate

Selenit / Wolframat Lösung

Es wurden 400 mg NaOH, 6 mg Na₂SeO₃ × 5 H₂O und 8 mg Na₂WO₄ × 2 H₂O in H₂O_{bidest} gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde auf 50 ml Schraubdeckelflaschen verteilt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Spurenelemente, mineralisch, sauer

Zunächst wurde 1,5 g $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ in 10 ml 25%iger HCl gelöst, diese Lösung wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt und folgende Salze wurden dazu gegeben:

Substanz	Menge [mg]
ZnCl_2	70
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	100
H_3BO_4	6
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	190
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	2
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	24
$\text{Na}_2\text{MO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	36

Anschließend wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 1000 ml aufgefüllt, die Lösung auf 50 ml Schraubdeckelflaschen verteilt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Spurenelemente, komplexiert

Es wurden ca. 800 ml erwärmtes $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ vorgelegt und folgende Salze darin gelöst:

Substanz	Menge [mg]
$\text{Na}_2 - \text{EDTA}$	5200
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	2100
H_3BO_3	30
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	100
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	190
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	24
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	2
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	144
$\text{Na}_2\text{MO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	36

Danach wurde der pH-Wert mit NaOH auf 6,5 eingestellt, die Lösung auf 1000 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgefüllt, auf 50 ml Schraubdeckelflaschen aufgeteilt und autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Natriumphosphatpuffer (Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄, pH 7,1; 1 mol/l)

Es wurden 178 g Na₂HPO₄ × 2 H₂O (Lösung 1) und 138 g NaH₂PO₄ × H₂O (Lösung 2) in je 1000 ml H₂O_{bidest} gelöst. Lösung 1 wurde dann so lange mit Lösung 2 titriert, bis ein pH-Wert von 7,1 erreicht war. Vor Gebrauch wurde 1: 40 verdünnt.

Vitamingemisch

In 100 ml Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄ (25 mmol/l) wurden folgende Komponenten gelöst:

Substanz	Menge [mg]
4 – Aminobenzoesäure	4,0
D (+) Biotin	1,0
Nicotinsäure	10,0
Calcium – D (+) Pantothenat	5,0
Pyridoxin × 2 HCl	15,0
Liponsäure	1,5
Folsäure	4,0
2 – Mercaptoethansulfonsäure Natriumsalz	25,0

Die Lösung wurde in 50 ml Schraubdeckelflaschen sterilfiltriert und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Riboflavin

In 100 ml wurden 2,5 mg Riboflavin H₂O_{bidest} mit Zusatz von 0,1 ml Essigsäure (100%) gelöst. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Vitamin B₁₂

Es wurden 5,0 mg Cyanocobalamin in 100 ml H₂O_{bidest} gelöst, die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Thiamin

Es wurden 10 mg Thiamin × 2 H₂O in 100 ml Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 50 mmol/l, pH 3,7 gelöst, die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C dunkel gelagert.

Natriumsulfid (1 mol/l)

In einen mit N_2 begasten Meßzylinder wurden ca. 70 ml sauerstofffreies H_2O_{bidest} vorgelegt. Anschließend wurden Na_2S Kristalle vorsichtig mit H_2O_{bidest} abgespült und abgetupft. Es wurden 24,02 g Na_2S in den Meßzylinder gegeben. Dann wurde mit anoxischem H_2O_{bidest} bis auf 100 ml aufgefüllt. Der Gasraum wurde erneut gegen N_2 ausgetauscht und der Meßzylinder wurde mit einem Stopfen luftdicht verschlossen. Die Sulfidlösung wurde unter Begasung mit N_2 in Serumflaschen abgefüllt. Diese wurden mit einem Butylstopfen verschlossen und anschließend in einem Klemmgestell autoklaviert. Die Lösung wurde bei $4^\circ C$ gelagert.

$NaHCO_3$ (1 mol/l)

Es wurden 84 g $NaHCO_3$ in 1000 ml H_2O_{bidest} gelöst, die Lösung wurde in Serumflaschen abgefüllt und mit Septen und Alucrimps verschlossen. Anschließend wurde der Gasraum gegen CO_2 ausgetauscht. Danach wurden die Flaschen im Klemmgestell autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Organische Säuren als Wachstumssubstrat

Die organischen Säuren Pyruvat und Propionat wurden als Stammlösung (1 mol/l) angesetzt. Es wurde jeweils das Natriumsalz eingewogen, der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 8 eingestellt und die Lösung wurde dann in 50 ml Rundhalsflaschen sterilfiltriert und bei $4^\circ C$ gelagert.

Laktat

Eine Laktatstammlösung (1 mol/l) wurde aus einer 50%igen Laktatlösung (Fluka, Buchs, Schweiz) angesetzt, in 50 ml Schraubdeckelflaschen sterilfiltriert und bei $4^\circ C$ gelagert.

Alkoholische Substrate

Ethanol, 1-Propanol und 1-Butanol wurden als Stammlösungen (1 mol/l, 1 mol/l und 0,5 mol/l) angesetzt, in 50 ml Schraubdeckelflaschen sterilfiltriert und bei $4^\circ C$ gelagert.

H_2 / CO_2 als Energiequelle bzw. Kohlenstoffquelle

Beim autotrophen Wachstum mit H_2/CO_2 enthielt der Gasraum des Kultivierungsgefäßes ein H_2/CO_2 Gasgemisch (20:80).

2.3.3 Stammhaltung

Die Stammhaltung der verschiedenen Stämme bzw. Anzuchten mit verschiedenen Substraten wurde in 20 ml Schraubdeckelröhrchen durchgeführt. Diese wurden mit 15 ml Medium befüllt, danach wurde Substrat aus einer sterilen Stammlösung zugegeben. Unter Anwendung der Hungate – Technik (Bryant 1972) wurden die Röhrchen steril mit N₂/CO₂ (90/10, v/v) begast und mit einem Butylseptum und einem Gewindelochdeckel verschlossen. Die Kulturen wurden bei 28°C (*Db. autotrophicum*), 37°C (*Dv. vulgaris*) und bei 10°C (*Dt. psychrophila*) inkubiert.

Folgende Substratkonzentrationen (*D. autotrophicum*) wurden standardmäßig eingesetzt:

Tabelle 2.3 Substratkonzentrationen

Substrat	Konzentration [mmol/l]
Na-Laktat	10
Ethanol	10
1 – Propanol	10
1 – Butanol	5
Na-Pyruvat	10
Na-Propionat	10

2.3.4 Zellsuspensionsversuche

Die Durchführung der Zellsuspensionsversuche erfolgte unter strikt anoxischen Bedingungen. Vorkulturen waren über mindestens drei Passagen an die jeweiligen Wachstumsbedingungen angepasst. Es wurden anschließend zwei Kulturen zu je 400 ml mit 5% (v/v) Vorkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (660 nm) von 0,2 inkubiert. Dann erfolgte die Zellernte unter anoxischen Bedingungen in einem sogenannten Anaerobenzelt. Die Zellen wurden in sterile 500 ml Zentrifugenbecher (Beckmann, Palo Alto, USA) überführt und 20 min bei 9000 rpm und 4°C zentrifugiert (J2MC Zentrifuge, JA10 Rotor, Beckmann, Palo Alto, USA). Der Überstand wurde verworfen, die erhaltenen Zellpellets wurden vereinigt und in ca. 100 ml substratfreiem Medium resuspendiert. Dann erfolgte eine erneute Zentrifugation unter identischen Bedingungen. Die Zellpellets wurden in 65 ml substratfreiem Medium resuspendiert und in Portionen von je 10 ml auf 20 ml Schraubdeckelröhrchen verteilt. Pro Röhrchen wurden je 50 µl Natrium-Dithionitlösung

(50 mg/ml) zugegeben, bevor die Röhrchen mit Septen und Lochdeckeln verschlossen wurden. 1 ml Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg)  berf hrt und in einer Tischzentrifuge (Biofuge 13, Heraeus Instruments, Osterode) abzentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde zur späteren Proteinbestimmung (siehe 2.4.1.2) bei - 20 C verwahrt. Außerhalb des Anaerobenzeltes wurde die N₂-haltige Gasphase in den Röhrchen, wegen des Bicarbonatpuffers, gegen ein N₂/CO₂ (90/10, v/v) Gemisch ausgetauscht. Den Röhrchen wurden nun die jeweiligen Testsubstrate mit einer N₂-begasten Spritze zugegeben. Die Probenahme für die Sulfidbestimmung erfolgte mit einer N₂-begasten Hamiltonspritze.

2.3.5 Wachstumsversuche mit Substratgemischen

Die Wachstumsversuche mit Substratgemischen wurden mit 200 ml oder 400 ml Kulturen in Achteckflaschen (250 bzw. 400 ml Volumen) durchgeführt. Die Vorkulturen für die Wachstumsversuche mit Substratgemischen waren über mindestens drei Passagen an die jeweiligen Kulturbedingungen angepasst. Die Kulturen für die Wachstumsversuche wurden mit je 5% (v/v) Vorkultur inokuliert. Bei jedem Wachstumsversuch dienten substratfreies, inokuliertes Medium und substrathaltiges, steriles Medium als Negativkontrollen. Als Maß für das Wachstum diente die Zunahme der optischen Dichte bei 660 nm. Nach Bestimmung der optischen Dichte wurden die entnommenen Proben in 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg)  berf hrt und für 5 min in einer Tischzentrifuge (Biofuge 13, Heraeus Instruments, Osterode) bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zur späteren Bestimmung der Substratkonzentrationen (HPLC, siehe 2.4.2) bei -20 C gelagert. Für die Bestimmung der Sulfidkonzentration (siehe 2.4.1) wurden Proben mit einer begasten Hamiltonspritze entnommen.

2.3.6 Massenanzuchten und Zellernten

Verwendete Lösungen: Waschpuffer

Substanz	Konzentration [mmol/l]
Tris/HCl, pH 7,5	100
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	5

Anzucht im großen Maßstab erfolgte in 5 l Schottflaschen, die anoxisch mit einem Butylstopfen und einem Lochdeckel verschlossen waren. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{660} 0,2 – 0,3) geerntet. Die Kulturen wurden in sterile 500 ml Zentrifugenbecher (Beckmann, Palo Alto, USA) überführt und für 20 min bei 9000 rpm und 4°C (J2MC Zentrifuge, JA 10 Rotor, Beckmann, Palo Alto, USA) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden, mit 100 ml Puffer vereinigt, resuspendiert und unter den vorher genannten Bedingungen erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in ca. 10 ml Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde in 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) aliquotiert. Danach wurde erneut für 20 min bei 14000 rpm und 4°C in einer Tischzentrifuge (Zentrifuge 5417r, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und die Zellpellets wurden in flüssigem N_2 gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C bis zur späteren Analyse mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese bzw. RNA Analyse.

2.4 Chemische Analysen

2.4.1 Sulfidbestimmung

Die Sulfidbestimmung erfolgte nach der Methylenblau-Methode (Cline 1969). Dabei wird N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin durch die Reaktion mit Schwefelwasserstoff über eine Zwischenverbindung zum farblosen Leucomethylenblau, welches durch Fe^{3+} zu Methylenblau oxidiert wird. Methylenblau absorbiert Licht der Wellenlänge 670 nm, so dass seine Bildung photometrisch bestimmt werden kann.

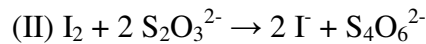
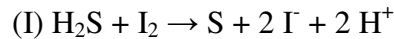
2.4.1.1 Herstellung der Standardlösung für die Sulfidbestimmung

Als Standard diente eine Na_2S Lösung (ca. 10 mmol/l), die unter anoxischen Bedingungen aus einer Stammlösung (1 mol/l) hergestellt worden war. Zur genauen Konzentrationsbestimmung wurde die Standardlösung mit Jod und Thiosulfat titriert.

In einer kleinen Flasche mit Rührfisch wurden 7,5 ml 0,1 N HCl Lösung und 2,5 ml 0,1 N KJO_3 Lösung vorgelegt. Nach Zugabe, unter Rühren, von 10 ml Na_2S Standard wurde die Lösung leicht bräunlich. Nun wurde mit einer Bürette, unter Rühren, solange 0,1 N $Na_2S_2O_3$ zugegeben, bis die Lösung milchig wurde. Nach Zugabe von 1-2 Tropfen Stärke

(lösliche Stärke 20 g/l) wurde die Lösung bläulich. Dann wurde mit 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ weiter titriert, bis die Lösung farblos wurde.

Der Berechnung der genauen Konzentration der Natriumsulfidlösung liegen folgende Reaktionen zu Grunde:



Zunächst läuft Reaktion I ab, wobei Jod im Überschuss vorliegt. Durch die Zugabe von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ wird das restliche Jod umgesetzt (Reaktion II). Die Sulfidkonzentration berechnet sich aus der Menge an Protonen ($n(\text{H}^+)$) und dem eingesetzten Volumen an Na_2S -Lösung, geteilt durch 2:

$$c(\text{S}^{2-}) = n(\text{H}^+) \times V_{\text{Standard}} / 2$$

Die Menge an Protonen ergibt sich aus der Differenz der eingesetzten Menge an KIO_3 ($n(\text{I})$) und der verbrauchten Menge an $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($n(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})$):

$$n(\text{H}^+) = n(\text{I}) - n(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})$$

Für die Berechnung von $n(\text{I})$ und $n(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})$ gilt:

$$n(\text{I}) = c(\text{KIO}_3) \times V(\text{KIO}_3)$$

$$n(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) = c(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) \times V(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})$$

wobei $V(\text{KIO}_3)$ bekannt ist und $V(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})$ dem bei der Titration verbrauchten Volumen an $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ entspricht.

2.4.1.2 Erstellung einer Eichgeraden

Es wurden verschiedene Volumina (1, 2, 4, 6, 8, und 10 μl) zur Erstellung einer Eichgeraden verwendet, wobei die Berechnung der eingesetzten Sulfidmenge anhand der vorher bestimmten Konzentration (siehe oben) der Sulfidlösung erfolgte. Die Konzentrationswerte wurden gegen die gemessenen Absorptionswerte aufgetragen. Aus der Steigung der Geraden konnte die Sulfidkonzentration in den untersuchten Proben bestimmt werden.

2.4.1.3 Herstellung der benötigten Lösungen

Für die Sulfidbestimmung wurden folgende Lösungen benötigt:

Lösung A: Zinkacetatlösung

Substanz	Menge
$(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn} \times 2 \text{H}_2\text{O}$	20 g
Essigsäure (100%)	1 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1000 ml

Lösung B: 0,2% Dimethyl-*p*-phenyldiaminlösung

Unter Kühlung wurden 200 ml konzentrierte H_2SO_4 in 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst. Nach Abkühlung dieser Lösung wurden 2 g Dimethyl-*p*-phenyldiammonium-dichlorid zugegeben und auf 1000 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 4°C im Dunkeln gelagert und unmittelbar vor Gebrauch 1 : 2,5 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt.

Lösung C: Eisensulfatlösung

Substanz	Menge
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$	10 g
H_2SO_4 konz.	2 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1000 ml

Die Lösung wurde kurz vor Gebrauch 1:50 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ verdünnt.

2.4.1.4 Sulfidbestimmung

Es wurde 1 ml Lösung A in Reagenzgläser vorgelegt. Mittels einer begasten Hamiltonspritze wurden 2 bis 20 μl Probe entnommen und direkt in Lösung A injiziert. Dann wurden 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, 1 ml Lösung B und 1 ml Lösung C zugegeben. Nach Zugabe von Lösung B und C wurde der Ansatz durch Vortexen durchgemischt. Danach wurden die Reagenzgläser 20 min im Dunkeln inkubiert. Unmittelbar vor der photometrischen Bestimmung bei 670 nm (UVmini 1240 UV-Vis Spectrometer, Shimadzu, Duisburg)

wurden die Proben nochmals gründlich gemischt. Unter Verwendung der Eichgeraden wurde die Sulfidkonzentration anhand der gemessenen Absorption ermittelt.

Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung mit zwei unterschiedlichen Probenvolumina vorgenommen und ein Durchschnittswert ermittelt.

2.4.2 Bestimmung organischer Säuren und Alkohole durch HPLC

Die Proben wurden mit einer N₂-begasten Spritze den Kulturen entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Danach wurde für 5 min bei 13000 rpm (Biofuge 13, Heraeus Instruments, Osterode) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor der Analyse wurden die Proben erneut für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde filtriert (Acrodisc Syringe Filters, 0,45 µm, 4 mm, Altmann Analysetechnik, Holzkirchen) und in 1,5 ml Schraubdeckelgläsern überführt. Diese wurden mit Teflonsepten und Lochdeckeln verschlossen.

Die chromatographische Auftrennung von Laktat, Acetat, 1-Propanol und Propionat erfolgte durch HPLC (Sykam, Fürstfeldbruck) über eine SS100, H⁺- Säule (300 × 8 mm, Sierra Separation, Reno, NV, USA). Als Eluent diente H₂SO₄ (5 mmol/l), bei einer Flussrate von 0,6 ml/min und einer Temperatur von 60°C. Unter diesen Bedingungen waren die Retentionszeiten für Laktat 13,2 min, für Acetat 15,4 min, für Propionat 17,6 min und für 1-Propanol 25,4 min. Laktat, Acetat und Propionat wurden mit einem UV Detektor (UVIS Detector, Linear Instruments, NV, USA) bei 210 nm detektiert. Die Detektion von 1-Propanol erfolgte mit einem RI Detektor (Typ 7515A, ERC, Tokyo, Japan).

2.4.3 Cytochromanalyse

Die spektrometrische Analyse der Cytochrome wurde mit zellfreien Extrakten durchgeführt. Hierzu wurden aerob geerntete Zellpellets verwendet. Diese wurden in Tris/HCl Puffer (pH 7,5; 0,1 mol/l) zu einer Konzentration von ca. 200 mg/ml Nassgewicht resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen unter Verwendung des PlusOne Sample GrindingKit (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben des Herstellers aufgeschlossen.

Die so erhaltenen Extrakte wurden vor der Analyse mit Tris/HCl Puffer zehnfach verdünnt. Zunächst wurden die verdünnten Extrakte durch Zugabe einiger Körnchen Ammoniumpersulfat oxidiert, dann wurde ein Spektrum mit einem UV/VIS Spectrometer (Lambda20, Rodgau-Jügesheim) von 400 – 800 nm bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Proben wurden anschließend durch Zugabe von Natriumdithionit reduziert, es wurde erneut ein Spektrum aufgenommen. Als Blindwert diente der 0,1 N Tris/HCl Puffer. Die Berechnung der Differenzspektren (reduziert – oxidiert) und die graphische Darstellung erfolgte anhand der ermittelten Absorptionwerte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA).

2.5 Biochemische und molekularbiologische Methoden

2.5.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese:

2.5.1.1 Zellaufschluss

Lösungen und Puffer:

Solubilisierungspuffer:

Substanz	Menge	Konzentration
Harnstoff	21.00 g	7 mol/l
Thioharnstoff	7.62 g	2 mol/l
CHAPS	1.50 g	3 % [w/v]
DTT	0.50 g	1 % [w/v]
IPG Puffer ^{a)}	0.50 ml	1 % [v/v]
H ₂ O _{bidest}	ad 50 ml	

a) Der pH-Bereich des IPG Puffers entsprach jeweils dem pH-Bereich des verwendeten IPG Streifens.

Als Probenmaterial für die zweidimensionale Gelelektrophorese wurden standardmäßig geerntete und bei -80°C gelagerte Zellpellets verwendet. Jedes Zellpellet wurde mit 1 ml Solubilisierungspuffer durch auf- und abpipettieren vollständig resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall (Bandelin Sono Plus UW70, Bandelin Electronics, Berlin) wobei nach 1 min Ultraschall für 1 min pausiert wurde. Beide Schritte wurden 3 bis 4 Mal wiederholt. Die Zellextrakte wurden immer mit Eis gekühlt. Durch

eine mikroskopische Kontrolle, es sollten nur Zelltrümmer zu sehen sein, wurde der Erfolg des Zellaufschlusses überprüft.

Die so erhaltenen Extrakte wurden dann für 2 h bei 15°C und 40000 rpm zentrifugiert (Ti-70.1 Rotor, L-70 Ultrazentrifuge, Beckmann, Palo Alto, USA). Vom Überstand wurde ein Aliquot zur Proteinbestimmung entnommen, der Rest wurde aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C bis zur späteren Verwendung gelagert.

2.5.1.2 Proteinbestimmung

Als Standard zur Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) diene Rinderserumalbumin (BSA). Es wurde eine BSA Stammlösung mit einer Konzentration von ca. 1 mg/ml angesetzt. Zur genauen Bestimmung der Konzentration des Standards wurde die Absorption bei 280 nm in einer Quarzküvette gemessen, als Nullwert diene H₂O_{bidest.} Anschließend wurde die genaue BSA Konzentration mit Hilfe der Gleichung 1 mg/ml = 0.667 Absorption bei 280 nm ermittelt. Die BSA Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für die Kalibrationskurve wurden Konzentrationen des Standards von 1 bis 10 µg/ml eingesetzt. Diese wurden aus einer 20 µg/ml Vorverdünnung hergestellt. Beim Ansetzen der vorverdünnten Lösung aus der BSA Stammlösung (ca. 1 mg/ml) wurde um den photometrisch bestimmten Faktor korrigiert.

Zur Proteinbestimmung nach Bradford wurde Bradfordreagenz (Biorad, München) verwendet. Es wurden 0,8 ml verdünnte Probe bzw. Standardlösung mit 0,2 ml Farbreagenz gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Reaktionsansätze erneut gut gemischt, dann wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 597 nm bestimmt (UVmini1240 UV-Vis Spektrometer, Shimadzu, Duisburg). Die Konzentration der unbekanntenen Proben wurde durch Abgleich der gemessenen Absorption mit der Eichgeraden ermittelt. Die Proben wurden in Verdünnungen von 1:10⁻³, 1:10⁻⁴ und 1:10⁻⁵ vermessen. Es wurden jeweils 3 Parallelansätze vermessen, um Durchschnittswerte zu ermitteln. Als Nullwert diene ein Reaktionsansatz mit H₂O_{bidest.}

2.5.1.3 Isoelektrische Fokussierung

Lösungen und Puffer:

Rehydratisierungspuffer:

Substanz	Menge	Konzentration
Harnstoff (ultrapure)	3,6 g	6,0 mol/l
Thioharnstoff	1,52 g	2,0 mol/l
CHAPS	0,20 g	2,0 % [w/v]
IPG-Puffer ^{a)}	50,00 µl	0,5 % [v/v]
DTT	40,00 mg	30,0 mmol/l
H ₂ O _{bidest}	ad 10 ml, Messkolben	

a) Der pH-Bereich des IPG Puffers entsprach dem pH-Bereich der verwendeten IPG Streifen.

Zur besseren Lösung des Harnstoffs wurde der Puffer in einem maximal 37°C warmen Wasserbad angesetzt. Nach Fertigstellung wurde der Rehydratisierungspuffer noch über einen Rodranfilter filtriert (Porengröße 0,2 µm).

Zur isoelektrischen Fokussierung wurde eine IPG-Phor (Amersham Biosciences, Freiburg) und kommerzielle IPG-Streifen (Amersham Biosciences, Freiburg) mit einem immobilisierten pH-Gradienten verwendet. Die Proteinmenge, die zur isoelektrischen Fokussierung eingesetzt wurde, variierte je nach Färbemethode zwischen 50 µg und 400 µg. Ein entsprechendes Volumen des Proteinextrakts wurde in Rehydratisierungspuffer verdünnt, so dass ein Gesamtvolumen von 450 µl pro Probe erreicht wurde. Nach gründlicher Durchmischung wurde die Probe dann gleichmäßig und luftblasenfrei zwischen den Elektroden des IPG Strip Holders verteilt. Die IPG-Streifen wurden dann jeweils mit der Gelseite nach unten eingelegt. Anschließend wurde der IPG-Streifen mit 1.5 ml Silikonöl (Immobiline Dry Strip Cover Fluid, Amersham) gleichmäßig überschichtet, mit einem Plastikdeckel verschlossen und auf der IPG-Phor plaziert.

Standardmäßig wurden für die isoelektrische Fokussierung folgende Laufbedingungen verwendet:

Schritt	Volt [V]	Zeit [h]
1	30	7
2	60	6
3	200	1
4	1000	1
5	1000-8000	0.5
6	8000	12 (1 pH-Schritt) 10 (pH 4 bis 7) 9 (pH 3-10, non linear)

Nach der Rehydratisierungsphase wurden zu Beginn von Schritt 3 befeuchtete Filterplättchen (Sample Application Pieces, Amersham Biosciences, Freiburg) zwischen Elektroden und Gel platziert, um das verzögerte Einlaufen von außerhalb der Elektroden befindlichen Probenmaterials zu verhindern.

2.5.1.4 *Equilibrierung*

Lösungen und Puffer:

Resolving Gel Buffer (RGB)

Substanz	Menge	Konzentration
Tris Base	18,2 g	1,5 mol/l
SDS	0,4 g	0,4 % [w/v]
H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml	

Vor dem vollständigen Auffüllen mit H₂O_{bidest} wurde mit 4 N NaOH ein pH-Wert von 8,8 eingestellt. Der Puffer wurde über einen 0,2 µm Filter filtriert. Eine Aufbewahrung bei 4°C erfolgte bis zu zwei Wochen. Eine Zugabe von 10 mg Natriumazid pro 100 ml erfolgte, wenn der Puffer zur Herstellung der Bromphenolblaulösung verwendet wurde.

Basic Equilibration Buffer (BEB)

Substanz	Menge	Konzentration
Harnstoff (ultrapure)	180,0 g	6 mol/l
Glyzerin	150,0 g	30 % (w/v)
SDS	10,0 g	2 %
RGB	16,7 ml	
H ₂ O _{bidest}	ad 500 ml	

150 ml H₂O_{bidest} und 150 g Glyzerin wurden vorgelegt und auf 33°C erwärmt. Dann wurde der Harnstoff portionsweise dazugegeben. Der Puffer konnte bis zu zwei Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden.

Bromphenol Blau Lösung (BPB)

Substanz	Menge	Konzentration
Bromphenol Blau	125 mg	0,25 %
RGB (+ Na-Azid)	ad 50 ml	

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert..

Equilibrierungspuffer I:

2 g DTT wurden in eine 250 ml Glasflasche eingewogen und in 200 ml BEB gelöst. 1 ml Bromphenol Blau Lösung wurde zugegeben.

Equilibrierungspuffer II:

8 g Jodacetamid wurden in eine 250 ml Schottflasche eingewogen und in 200 ml BEB gelöst und es wurde 1 ml Bromphenol Blau Lösung zugegeben.

Sowohl Equilibrierungspuffer I als auch Equilibrierungspuffer II wurden unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.

Die Equilibrierung erfolgte unmittelbar nach Beendigung der IEF. Dazu wurden die IPG-Streifen kurz unter laufendem H₂O_{bidest} abgespült und einzeln in Reagenzröhrchen mit 15 ml Equilibrierungspuffer I gelegt. Die Röhrchen wurden mit einem Lamellenstopfen

verschlossen und so auf einen Schüttler (GFI3014, GFL) gelegt, dass die IPG Streifen im Puffer lagen. Es erfolgte ein Inkubation für 15 min bei 20 rpm. Anschließend wurde der Equilibrierungspuffer I abgossen und durch 15 ml Equilibrierungspuffer II ersetzt und es wurde erneut auf dem Schüttler für 15 min bei 20 rpm inkubiert. Nach der Equilibrierung wurden die Streifen kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gespült, kurz in Laufpuffer getaucht und in die Taschen der SDS Gele eingelegt.

2.5.1.5 SDS-PAGE

Lösungen und Puffer:

Laufpuffer (10 fach)

Substanz	Menge	Konzentration
Tris Base	30,28 g	250,00 mmol/l
Glyzin	144,13 g	1,92 mol/l
SDS	10,00 g	10,00 % (w/v)
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1000 ml	

Vor Gebrauch wurde der Puffer 1:10 verdünnt, für einen Elektrophoreselauf wurden 10 l Laufpuffer benötigt.

Slab Gel Buffer (Tris pH 8,7 -9,0; 1,5 mol/l)

Substanz	Menge	Konzentration
Tris Base	130,8 g	1,08 mol/l
Tris HCl	66,3 g	0,42 mol/l
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1000 ml	

Die Lagerung des Slab Gel Buffers erfolgte bei 4°C.

SDS Stock Solution

10 g SDS wurden in 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ unter leichtem Erwärmen gelöst (Endkonzentration: 10%, (w/v)) und anschließend über einen 2 µm Filter filtriert.

Isobutanol (H_2O gesättigt)

In einer Glasflasche wurden $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und Isobutanol zu gleichen Teilen gemischt.

Ammoniumpersulfat Lösung

0,5 g Ammoniumpersulfat wurden in 5 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst (Endkonzentration 10% (w/v)).

Die Ammoniumpersulfat Lösung wurde stets unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.

Gelpolymer (für 14 Einzelgele, Ettan DaltII System, Amersham Biosciences, Freiburg)

Substanz	Menge [ml]
Duracryl	415,00
Slab Gel Buffer	247,00
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	325,00
SDS 10%	10,30
TEMED	0,51
Ammoniumpersulfat	2,49

Zunächst wurde das Duracryl in einer 1 l Saugflasche vorgelegt. Dann wurden die entsprechende Menge Slab Gel Buffer und $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ dazu filtriert (Cellulose Nitrat Filter, 0,2 μm , Satorius, Göttingen). Anschließend wurde das Gemisch für ca. 10 min, mit Hilfe einer Membranpumpe (Knf, Neuberger, Freiburg) entgast. Danach wurde die SDS Lösung zugegeben. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von TEMED und Ammoniumpersulfat initialisiert und die Lösung wurde vorsichtig auf dem Magnetrührer gemischt.

Für die Gelelektrophorese wurde das Ettan Dalt II System (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Die Glasplatten wurden unmittelbar vor Gebrauch mit Ethanol gereinigt und die Gießkassette nach den Angaben des Herstellers zusammengebaut.

Die entgaste Gellösung wurde vorsichtig in den Gießfunnel eingefüllt, durch kurzes Öffnen der Schlauchklemme am Schlauch des Funnels wurden Luftblasen entfernt, bevor der Schlauch an die Gießkassette angeschlossen wurde. Dann wurde die Polymerlösung vom Funnel in die Gießkassette geleitet. Nachdem die Polymerlösung in der Gießkassette den gewünschten Stand (ca. 3 cm unterhalb der Oberkante der Glasplatte) erreicht hatte, wurde die Schlauchklemme geschlossen und Glycerinlösung (50 % (v/v) in Laufpuffer mit 4 ml Bromphenol Blau Lösung pro l) schrittweise in den seitlichen Tank eingefüllt. Die schwerere Glycerinlösung drückte die verbliebene Polymerlösung vollständig aus dem seitlichen Schlauch in die Gießkassette. Die maximale Füllhöhe für die Glycerinlösung war die Unterkante der Glasplatten. Danach wurden die Gele mit je 2 ml Isobutanol (H_2O

gesättigt) überschichtet. Nach der Polymerisierung der Gele (ca 2 bis 3 h) wurde das Isobutanol gegen 0,1% SDS Lösung ausgetauscht.

Vor dem Einsetzen der Gele in den Elektrophoretank wurde dieser zunächst bis zur 7,5 l Markierung mit Laufpuffer befüllt. Die Gele wurden von Gelresten befreit und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ abgespült. Nach dem Einsetzen der Gelplatten wurden die Geltaschen mit Laufpuffer gespült und von Luftblasen befreit. Der Laufpuffer wurde zunächst bis zur Oberkante der kürzeren Glasplattenscheibe eingefüllt. Das Einlegen der IPG-Streifen unmittelbar nach der Equilibrierung erfolgte so, dass die anodische Seite nach links und die Gelseite nach vorne zeigten. Damit die IPG-Streifen vollständig auf der Geloberfläche auflagen, wurde vorsichtig mit einem dünnen Plastikblatt („separator sheet“) nachgeschoben. Sie wurden mit 1 – 2 ml Agarose (1% Agarose + Bromphenolblau) fixiert. Nach Erkalten der Agarose wurde der Tank vollständig mit Laufpuffer befüllt.

Das Einlaufen der Proben in die Gele erfolgte bei 30 Watt für ca. 30 min. Dann wurde die Stromleistung auf 180 Watt erhöht. Die Einstellungen des Geräts waren: „continuous run“, Pumpe auf „Auto“ und Temperatur auf 25°C. Die Elektrophorese wurde gestoppt, kurz bevor der Bromphenolblau Marker das untere Ende der Gele erreicht hatte. Unter diesen Bedingungen dauerte die Elektrophorese ca. 6 h. Durch Erniedrigen der Stromleistung konnte, bei Bedarf, eine Verlängerung der Laufzeit erreicht werden. Nach der Elektrophorese wurden die Gele sofort fixiert, wobei zuvor die Position des anodischen Endes des IPG-Streifen durch Entfernen einer Ecke auf dem SDS Gel markiert wurde.

2.5.1.6 Färbemethoden

Je nach Verwendungszweck der Gele wurden verschiedene Färbemethoden verwendet. Für einen ersten Überblick wurden die Gele mit Silber gefärbt, war eine spätere Analyse ausgestochener Spots notwendig wurden die Gele mit Coomassie gefärbt und für eine Quantifizierung wurde der Farbstoff SYPRO™ Ruby verwendet.

Silberfärbung (Heuskoven und Dernick 1988)

Lösungen

Fixativ:

Substanz	Menge	Konzentration
Ethanol	2,5 l	50 % (v/v)
Essigsäure	500,0 ml	10 % (v/v)
H ₂ O _{bidest}		ad 5 l

Inkubationslösung:

Substanz	Menge	Konzentration
Na-Acetat	205,0 g	0,50 mol/l
Na-Thiosulfat	1,0 g	0,02 % (w/v)
Ethanol	1,5 l	30,00 % (v/v)
H ₂ O _{bidest}		ad 5 l

Silbernitratlösung:

5 g Silbernitrat wurden in 5 l H₂O_{bidest} gelöst (Endkonzentration: 0,1% (w/v)). Die Silbernitratlösung wurde unmittelbar vor Gebrauch angesetzt.

Waschlösung:

125 g Na₂CO₃ wurden in 5 l H₂O_{bidest} gelöst (Endkonzentration: 2,5% (w/v)).

Entwicklung:

Substanz	Menge	Konzentration
Na ₂ CO ₃	125,00 g	2,50 % (w/v)
Formalin (37%) ^{a)}	1,35 ml	0,01 % (v/v)
NaHCO ₃	2,55 g	0,05 % (w/v)
Thimerosal ^{a)}	1,00 g	0,02 % (w/v)
H ₂ O _{bidest}		ad 5 l

a) Wurden unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt.

Stopp-Lösung:

Für die Stopp-Lösung wurden 92,5 g Na-EDTA (Endkonzentration: 0,05 mol/l) in 5 l H_2O_{bidest} gelöst.

Die Gele wurden mit je 400 ml der entsprechenden Lösung in Plastikschaalen auf einem Schüttler (GFL3014, GFL) inkubiert. Die Fixierung erfolgte für mindestens zwei Stunden. Danach wurden die Gele für eine Stunde in der Inkubationslösung inkubiert. Vor der Inkubation in Silbernitrat wurden die Gele zwei Mal für fünf Minuten mit H_2O_{bidest} gewässert. Nach einer Stunde Inkubation in der Silbernitratlösung wurden die Gele für wenige Sekunden in H_2O_{bidest} und dann für ca. eine Minute in der Na_2CO_3 -Lösung inkubiert. Die Entwicklung erfolgte unter Schwenken für 5 bis 20 min. Danach wurden die Gele für mindestens 10 min in der Stopp Lösung inkubiert. Die Gele wurden dann zunächst für mindestens 5 min in H_2O_{bidest} inkubiert und bis zur Auswertung in frischem H_2O_{bidest} aufbewahrt.

Coomassie (verändert nach Doherty et al. 1998)

Lösungen:

Fixativ:

Substanz	Menge	Konzentration
Methanol	2,5 l	50 % [v/v]
H_3PO_4	117,5 ml	2 % [v/v]
H_2O_{bidest}		ad 5 l

Inkubationslösung:

Substanz	Menge	Konzentration
Methanol	1,7 l	34 % [v/v]
H_3PO_4	117,5 ml	2 % [v/v]
$(NH_4)SO_4$	850,0 g	17 % [w/v]
H_2O_{bidest}		ad 5 l

Die Gele wurden mit 400 ml der entsprechenden Lösung in Plastikschaalen auf dem Schüttler (GFL3014, GFL) bei 20 rpm inkubiert. Nach mindesten 2 h Fixierung wurden die

Gele drei Mal für 30 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ inkubiert, bevor sie in die Inkubationslösung überführt wurden. Nach einer Stunde Inkubation wurden pro 400 ml Inkubationslösung 0,264 g Coomassie G250 zugegeben und die Gele für bis zu 5 Tage auf einem Schüttler (GFL3014, GFL) bei 20 rpm inkubiert. Um überschüssige Farbreste zu entfernen wurden die Gele dann für 1 min mit 25 % (v/v) Methanol gewaschen und anschließend bis zur späteren Analyse in Wasser gelagert.

SYPRO Ruby™ (Lopez et al. 2000)

Fixativ bzw. Waschlösung:

Substanz	Menge	Konzentration
Methanol	500 ml	10 % [v/v]
Essigsäure	350 ml	7 % [v/v]
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$		ad 5 l

Die Fixierung in 400 ml Fixativ pro Gel erfolgte für mindestens zwei Stunden in Plastikschaalen auf dem Schüttler. Dann wurden die Gele für 1,5 bis 3 h mit 250 ml SYPRO™ Ruby (Proteomic Solutions, St. Marcel, Frankreich) pro Gel inkubiert. Danach wurden die Gele mit 400 ml Waschlösung für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert, gefolgt von einem Waschschriff in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ für mindestens 5 min. Bis zur Auswertung wurden die Gele in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelagert.

2.5.1.7 Gelauswertung

Zur Digitalisierung wurden Silber und Coomassie gefärbte Gele mit einem IMAGE Scanner (Fabrikat, Amersham Biosciences, Freiburg) unter Verwendung des Programms Labscan bzw. MagicScan (Amersham Biosciences, Freiburg) eingescannt. Die Bildauswertung erfolgte visuell.

Zur Quantifizierung wurden SYPRO™ Ruby Gele mit einem Typhoon Scanner (Amersham Biosciences, Freiburg) digitalisiert (Laser: Green, Filter: Rox610BP30, PMT: 500 – 600 Volt, Sensitivity: normal). Die Signale sollten auf keinen Fall übersättigt sein (Übersättigung ab Signalgröße von 100000 pro Peak). Die Detektion der Spots und die Gelauswertung erfolgte mit dem Programm Image Master (Amersham Biosciences, Freiburg). Die Kalkulation der Induktionsraten basierte auf der Annahme, dass die Gesamtintensität aller Proteinspots der in die 2DE eingesetzten Proteinmenge entspricht.

Die relative Veränderung der Proteinhäufigkeit (Ratio) wurde dann mit Hilfe der berechneten Proteinmengen bestimmt.

2.5.1.8 Konservierung der Gele

Glyzerinlösung:

Substanz	Menge	Konzentration
Glyzerin	200 ml	10% [v/v]
Ethanol	600 ml	30% [v/v]
H ₂ O _{bidest}	ad 2 l	

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden die Gele getrocknet. Dazu wurden Hoefer Trockenrahmen (Amersham Biosciences, Freiburg) und Cellophansheets (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Zunächst wurden die Gele für ca. 10 min in der Glyzerinlösung inkubiert, die Cellophansheets wurden für 2 bis 3 min in der gleichen Lösung eingeweicht. Beim Einspannen der Gele in die Trockenrahmen wurde strikt darauf geachtet Luftblasen zu vermeiden. Die Gele wurden über Nacht getrocknet.

2.5.1.9 Analyse ausgestochener Proteinspots

Die Analyse ausgestochener Spots mit Hilfe von MALDI-TOFF MS bzw. Edmann-Sequenzierung wurde von der Firma TopLab (München) durchgeführt.

2.5.2 Transkriptanalyse

Die Analyse der Expression ausgewählter Gene erfolgte mit gängigen molekularbiologischen Techniken, vor allem RT-PCR und Real-Time RT-PCR. Zur Überprüfung wurden die entsprechenden PCR Produkte zunächst mit dem Perfectprep Gel Cleanup Kit (Eppendorf, Hamburg) aufgereinigt, anschließend sequenziert (siehe 2.4.2.5 Sequenzierung) und mit der vorhandenen genomischen Sequenz von *Desulfobacterium autotrophicum* verglichen.

Alle Lösungen, die für die RNA Analytik verwendet wurden mußten RNase frei sein. Deshalb wurden sie in der Regel entweder gekauft oder mit DEPC behandelt, bzw. mit DEPC H₂O angesetzt. Pro 1 Lösung wurden 2 ml DEPC zugegeben und für 12 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Um verbliebenes DEPC zu inaktivieren, wurden die

Lösungen anschließend für 45 min autoklaviert. Plastikwaren, z.B. Pipettenspitzen wurden ebenfalls für 45 min autoklaviert. Für die RNA Analytik wurden Zellpellets aus den gleichen Ernten, wie für die 2DE verwendet.

2.5.2.1 RNA Isolierung

Phenol-Extraktion

Lösungen:

Saline/Tris/EDTA-Puffer (STE) :

Substanz	Menge	Konzentration
TrisHCl (1 mol/l, pH 7,5)	50 μ l	10 mmol/l
EDTA (0,5 mol/l)	10 μ l	1 mmol/l
NaCl (1 mol/l)	500 μ l	100 mmol/l
DEPC H ₂ O		ad 5 ml

Das Zellpellet wurde in STE-Puffer resuspendiert, wobei pro 100 mg Zellpellet 1 ml STE-Puffer verwendet wurde. Pro 500 μ l Zellsuspension wurden dann 900 μ l saures Phenol (Aqua Roti Phenol, Roth, Karlsruhe) (auf 60°C erwärmt) und 20 μ l 10% SDS zugegeben. Die Lösung wurde gut gemischt und unter Schütteln für 8 min bei 60°C inkubiert. Danach wurde die Lösung auf Eis abgekühlt und für 20 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein neues 15 ml Plastikgefäß (Sarstedt, Hamburg) überführt und es wurde Na-Acetat (3 mol/l) bis zu einer Endkonzentration von 250 mmol/l zugegeben. Diese wässrige Phase wurde erneut mit saurem Phenol extrahiert und es wurde wieder unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mindestens zweimal mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) (Fluka, Buchs, Schweiz) extrahiert. Diese Extraktion wurde so oft wiederholt, bis keine Interphase mehr vorhanden war. Dann wurde die RNA, durch Zugabe von 2,5 Volumen 96% Ethanol (für die Molekularbiologie, Merck, Darmstadt), bei -80°C präzipitiert. Anschließend wurde für 1 h bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, d.h mit Ethanol überschichtet und dann für 15 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und das Pellet wurde für ca. 15 min getrocknet und dann in DEPC H₂O aufgenommen.

Alle Zentrifugationsschritte wurden mit einer Hettich Universal 30 RF Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen) durchgeführt.

DNase – Verdau:

Der Reaktionsansatz für den DNase –Verdau setzte sich folgendermaßen zusammen:

Substanz	Menge
RNA-Lösung	830 µl
DNase Puffer 10 fach	100 µl
DTT (1mol/l)	10 µl
RNase Inhibitor	10 µl
DNase	50 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 1 bis 1,5 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die RNA erneut mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol extrahiert, um verbliebene Verunreinigungen und Enzymreste zu entfernen. Für diese Aufreinigung wurden Phase-Lock Tubes (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Diese wurden zunächst vorbereitet indem sie für 20 bis 30 s bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert wurden. Die Lösung wurde in das Phase-Lock Tube überführt und es wurde Na-Acetat (3 mol/l) bis zu einer Endkonzentration von 25 mmol/l zugegeben. Anschließend wurde ein Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol hinzugefügt. Die Lösung wurde für 5 min gut gemischt. Danach wurde für 5 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde nach der Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol (96%, reinst) bei -80°C für 30 min präzipitiert. Dann wurde in einer gekühlten Tischzentrifuge (5417r, Eppendorf, Hamburg) für 30 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in PCR-H₂O aufgenommen, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die RNA Konzentration wurde mit einem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Als Küvette diente eine spezielle Plastikkuvette (UVette, Eppendorf, Hamburg). Für jede RNA Lösung wurde eine Dreifachbestimmung gemacht und ein Durchschnittswert gebildet.

Um sicher zu stellen, dass die RNA frei von DNA Kontamination war, wurde die RNA-Lösung in einer PCR (siehe 2.4.2.3 PCR) mit spezifischen Primern eingesetzt.

Die RNA Qualität wurde mit dem Agilent Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, USA) überprüft. Dabei wurde der RNA6000nano LabChip Kit (Agilent, Palo Alto, USA) und die RNA6000 Ladder (Ambion, Huntingdon, UK) nach Angaben der Hersteller verwendet.

2.5.2.2 cDNA Synthese

Bei der cDNA Synthese wird mit RNA als Matrize durch eine reverse Transkriptase einzelsträngige DNA synthetisiert. Zur cDNA Synthese wurden standardmäßig 2 µg Gesamt RNA eingesetzt. Es wurde RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase und der mitgelieferte 10fach Puffer (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet. Zunächst wurden 2 µg RNA und 20 pmol genspezifischer Antisense-Primer in einem Gesamtvolumen von 13 µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) gut gemischt. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 70°C in einem Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg) inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Danach wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt und weitere Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Es wurden 4 µl 10fach Puffer und 2 µl dNTP Mix (Sigma – Aldrich, Taufkirchen) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl reverser Transkriptase erfolgte die cDNA Synthese für eine Stunde bei 42°C. Danach wurde die Reaktion durch 5 min Inkubation bei 70°C gestoppt. Die cDNA Syntheseansätze wurden ohne weitere Behandlung für die weiteren Analysen eingesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Als weitere Kontrolle diente ein cDNA Syntheseansatz ohne reverse Transkriptase.

2.5.2.3 PCR

Bei der PCR (Polymerasekettenreaktion) handelt es sich um eine Methode zur Vervielfältigung von DNA Fragmenten. Dabei werden zunächst DNA Doppelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung). Darauf folgt die Annealing-Phase bei der sich sequenzspezifische, synthetische Oligonukleotide (Primer) an die DNA Stränge anlagern. In der folgenden Synthesephase werden ausgehend von den Primern, DNA Stränge durch hitzestabile DNA Polymerasen synthetisiert. Dieser Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Synthese wird 25 bis 30 Mal wiederholt, bei jedem Zyklus bilden sich neue PCR Produkte. Die Menge der Produkte nimmt dabei exponentiell zu.

Als DNA Polymerase wurde RedTaqTM mit einem mitgelieferten Puffersystem verwendet (Sigma – Aldrich, Taufkirchen).

Ein Standard – Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Substanz	Menge
10 × Puffer	2,50 µl
dNTP Mix	1,00 µl
Forward Primer (10 µmol/l)	1,00 µl
Reverse Primer (10 µmol/l)	1,00 µl
BSA (3 mg / ml)	1,25 µl
MgCl ₂ (20 mmol/l)	2,50 µl
Template	variabel
TaqPolymerase	1,00 µl
PCR H ₂ O	variabel
Gesamt	25,00 µl

In der Regel wurde folgendes PCR Programm verwendet, wobei die Annealing-Temperatur dem jeweiligen Primerpaar angepasst wurde:

Schritt	Temperatur	Dauer	Prozess
1	94°C	2 min	Denaturierung
2	Hold 94°C	Enter	Zugabe von Polymerase
3	94°C	1 min	Denaturierung
4	50°C – 60°C	30 s	Annealing
5	72°C	30 s	Elongation
6	Go to Step 2, repeat 27		
7	72°C	5 min	
8	Hold 20°C		

PCR Reaktionen wurden in einem Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt.

2.5.2.4 Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophorese wurde zur Größenbestimmung von DNA Fragmenten verwendet. In der Regel wurden 1,5%ige, horizontale Agarosegele (LE-Agarose, Biozym, Hessisch Oldendorf) verwendet. Für Minigele (Minigelapparatur, Biorad, München) wurden 0,45 g Agarose in 30 ml TAE (Eppendorf, Hamburg) und für größere Gele (Midigelapparatur, Biorad, München) 1,5 g Agarose in 100 ml TAE gelöst. Die Elektrophorese wurde mit $1 \times$ TAE als Laufpuffer in einer Elektrophoresekammer (Sub-Cell GT Agarose Gel Elektrophoresis System, Biorad, München) bei 60 – 80 V für ca. 60 min durchgeführt. Als Spannungsgeber diente ein Powerpack 600 (Biorad, München). Die Proben wurden in der Regel mit 1/8 Volumen Ladepuffer (Gel Loading Solution, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versetzt. Bei PCR Proben, die mit RedTaqTM (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) amplifiziert wurden, war kein Ladepuffer erforderlich. Als Marker wurde GeneRulerTM 100bp Ladder Plus (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für ca. 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml H₂O) gefärbt, anschließend in destilliertem Wasser für 5 min entfärbt und dann mit einem Master VDS-CL Gerät (Amersham Biosciences, Freiburg) digital dokumentiert. Ethidiumbromid wurde bei 366 nm angeregt.

2.5.2.5 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR wurde durchgeführt, um die Transkriptmengen der Zielgene relativ, d.h. im Verhältnis zu einem Referenzzustand, zu quantifizieren. Ein Referenzgen dient dabei zur Normalisierung, d.h. um eventuelle Unterschiede der verschiedenen RNA Präparationen auszugleichen. Als Referenzgen diente die 16S RNA, da sie in den Testzuständen nachweislich in vergleichbaren Mengen vorkam. Da die 16S RNA grundsätzlich in sehr großen Mengen vorkommt, wurde die entsprechende cDNA um den Faktor 100 verdünnt.

Die Real-Time Analysen wurden mit einem ABIPrismTM 7700 Sequence Detection System unter Verwendung der Sequence Detector 1.7 Software (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Es wurde SybrGreen als Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet. Um sicher zu gehen, dass ein einzelnes spezifisches Produkt für die Zunahme an Fluoreszenz verantwortlich war, wurde im Anschluss an die Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse (siehe unten) durchgeführt. Es

wurden 96 Optical Well Plates (Applied Biosystems, Foster City, USA) für die Real-Time RT-PCR Analytik verwendet.

Real-Time PCR

Bei jedem Real-Time RT-PCR Experiment wurden je drei parallele Reaktionsansätze angesetzt. Ein Einzelansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Substanz	Menge	Konzentration
SybrGreenMix	12,50 µl	1 fach
Forward Primer (10 µM)	0,50 µl	100 nmol
Reverse Primer (10 µM)	0,50 µl	100 nmol
BSA (3 mg/ml)	1,25 µl	1,5 µg / ml
PCR H ₂ O	8,25 µl	
Template	2,00 µl	
Insgesamt:		25 µl

Es wurde jeweils ein Mastermix ohne Template angesetzt. Dieser wurde dann in Aliquots zu je 69 µl aufgeteilt. Danach erfolgte die Zugabe von je 6 µl des entsprechenden Templates. Die Reaktionsansätze wurden gut durchmischt. Dann wurden je 25 µl in die 96 Optical Well Plate (Applied Biosystems, Foster City, USA) pipettiert und mit optischen Deckeln (optical caps, Applied Biosystems, Foster City, USA) verschlossen. Ein Programm bestand aus jeweils drei Phasen: erstens ein Schritt von 2 min bei 50°C zur Aktivierung der Polymerase und zweitens ein anschließender Denaturierungsschritt für 10 Minuten bei 95°C. Die dritte Phase gliederte sich in zwei Temperaturschritte: 15 s bei 95°C und 30 s bei einer Temperatur zwischen 50 und 60°C, abhängig von der Annealingtemperatur der verwendeten Primer. Diese Phase wurde 40 Mal wiederholt.

Schmelzkurvenanalyse (Ririe et al. 1997)

Im Anschluss an jedes Real-Time RT-PCR Experiment wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um sicher zu stellen, dass die gemessenen Fluoreszenzdaten auf ein einzelnes spezifisches Produkt zurückgingen und nicht von Nebenprodukten oder Primerdimeren herrühren. Das Programm für diese Analyse bestand ebenfalls aus drei Temperaturschritten: erstens ein Denaturierungsschritt bei 95°C, zweitens eine Minute bei 50°C und drittens ein langsamer Temperaturanstieg von 50°C auf 95°C über einen

Zeitraum von 20 min. Im Verlauf dieses Temperaturgradienten wurden die DNA Doppelstränge und gleichzeitig Fluoreszenzdaten aufgezeichnet. Der Schmelzpunkt ist für jedes PCR Produkt spezifisch. Die Daten wurden exportiert und mit dem Programm Dissociation curves 1.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA) ausgewertet.

Kalkulationen

Bei der „Real-Time PCR“ wird die Menge an gebildetem PCR-Produkt nach jedem Zyklus gemessen. Sobald eine bestimmte Produktmenge erreicht ist, überschreitet die Fluoreszenz einen Schwellenwert ab dem eine Differenzierung vom Hintergrund möglich ist. Der Zyklus, bei dem das der Fall ist wird als CT (Cycle Treshold) bezeichnet. Je niedriger der CT Wert ist, desto mehr Template war ursprünglich im Reaktionsansatz vorhanden. Bei der relativen Quantifizierung wird das Transkript des Zielgens (Ziel) in der zu untersuchenden RNA Präparation (Probe) relativ zur Transkriptmenge aus einer anderen Präparation (Kalibrator) betrachtet. Die RNA Präparationen stammen dabei aus unterschiedlich angezogenen Zellen. Um Variationen zwischen den einzelnen PCR Ansätzen auszugleichen, wurde gegen ein Referenzgen (16SrDNA) normalisiert. Diese vergleichende CT Methode (Livak und Schmittgen 2001) setzt allerdings voraus, dass die PCR Effizienzen für Referenzgen und Zielgen gleich gut sind. Um Fehler, die durch unterschiedliche PCR Effizienzen auftreten können (Kamphuis et al. 2001) zu vermeiden, wurden die PCR Effizienzen mit dem Programm LinReg (Ramakers et al. 2003) berechnet und in der folgenden Formel (Pfaffl 2001) berücksichtigt:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Referenz}})^{CT_{\text{Probe}}}}{(E_{\text{Ziel}})^{CT_{\text{Probe}}}} \div \frac{(E_{\text{Referenz}})^{CT_{\text{Kalibrator}}}}{(E_{\text{Ziel}})^{CT_{\text{Kalibrator}}}}$$

2.5.2.6 DNA-Sequenzierung

Sequenzierung von DNA (PCR-Produkte) wurden unter Verwendung von BigDyeTMv3 Chemie (Applied Biosystems, Forster City, USA) durchgeführt. Um die RT-PCR Produkte zu verifizieren, wurden diese in einem 50 µl PCR Ansatz amplifiziert. Dieser wurde dann mit dem Perfectprep Gel Cleanup Kit (Eppendorf, Hamburg) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) und es wurden ca. 10 ng für eine Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

Ein Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Substanz	Menge
BigDye	1 µl
2,5fach Reaktionspuffer	1 µl
Primer (20 nmol / µl)	1 µl
Template	variabel
PCR H ₂ O	ad 5 µl

Folgendes Standardprogramm wurde verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit
1	96°C	20 s
2	96°C	10 s
3	50°C	5 s
4	60°C	4 min
5	30 Wiederholungen	Schritt 2 bis 4
6	21°C	30s
7	End	

Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit Dry Sephadex G-50 Superfine (Amersham Biosciences, Palo Alto, USA), das in eine MultiScreen HV Plate (Millipore, Schwalbach) geladen wurde, nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Die elektrophoretische Analyse der Sequenzreaktionen erfolgte mit einem Kapillarelektrophoresesystem (ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystems, Foster City, USA).

2.5.2.7 *Verwendete Primer*

Die meisten der verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Primer3 Software (Rozen und Skaltetsky 2000) erstellt. Diese ist unter der Internetadresse: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi frei zugänglich. Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

Folgende Primer wurden verwendet:

Tabelle 2.4 Primernamen und Primersequenzen

Name	Sequenz
DbAADH1_for	5' – ATGTCAAACGGAGAAGCA – 3'
DbAADH2_rev	5' – TATCTGTGGGATTGGGAAC – 3'
DbACoA-1_for	5' – TGGAGAACTGGGGCTGTG – 3'
DbACoA-2_rev	5' – CCGTAAGAAGAAGGGTGTGG – 3'
DbACoA-3_for	5' – GTCAGGGGAAAGAACCACCT – 3'
DbACoA-4_rev	5' – ACCGTCAACAAACTCAACACC – 3'
DbACoA-5_for	5' – CCAAGTTCCACAACCTTCTCT – 3'
DbACoA-6_rev	5' – TCATCCATACCCACAAGCAC – 3'
DbAMMM5_for	5' – CCCAAAAATCCAAAATCCAAG – 3'
DbAMMM6_rev	5' – CACATAGTAGGAACCGCCAAG – 3'
16Sfor ^a	5' – AACCGAACATCTCACGACACG – 3'
16Srev ^a	5' – AGTGCCTTCGGGAACCTCAGAG – 3'

^a Diese Primersequenzen stammen aus der Veröffentlichung von Neretin et al. 2003

Zielgene und Annealingtemperaturen sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Tabelle 2.5 Annealingtemperaturen, Zielgene und Produktgrößen

Primer	Zielgen	Annealing [°C]	Produkt [bp]
DbAADH1_for	<i>adh</i>	50	238
DbAADH2_rev			
DbACOA1_for	<i>codh1</i>	57	203
DbACOA2_rev			
DbACOA3_for	<i>acs/codh</i>	53	216
DbACOA4_rev			
DbACOA5_for	<i>codh2</i>	53	172
DbACOA6_rev			
DbAMMM5_for	<i>mut</i>	60	279
DbAMMM6_rev			
16Sfor	<i>16SrDNA</i>	60	69
16Srev			

2.6 Bioinformatische Arbeiten

Dieser Arbeit liegt eine Version von November 2004 des Genoms von *Db. autotrophicum* zu Grunde. Die Vorhersage von ORFs und eine automatische Annotation wurde mit dem Programm GenDB (Meyer et al. 2003) von der bioinformatischen Abteilung im Hause übernommen. In diesem Datensatz wurden Gene durch gezielte BLAST Sequenzvergleiche (Altschul et al. 1990.) gesucht. Vergleichsequenzen stammten oft aus den Datensätzen von *Desulfotalea psychrophila* und *Desulfovibrio vulgaris*. Die so identifizierten ORFs wurden dann überprüft und die Genfunktionen wurden anhand der nächsten BLAST Hits und anhand der automatischen Annotation zugewiesen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Analyse der Temperaturanpassung von *Desulfovibrio autotrophicum* mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese

Im Rahmen eines Projekts zur Untersuchung der Temperaturanpassung von *Desulfovibrio autotrophicum* (Rabus et al. 2002) wurden Zellextrakte von *Db. autotrophicum*, die an drei verschiedene Temperaturen (4, 10 und 28°C) angepasst waren, mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese analysiert. Der für die isoelektrische Fokussierung gewählte pH Bereich von pH 4 bis 7 deckt, bei Prokaryonten, die meisten Zellproteine ab (Link et al. 1997).

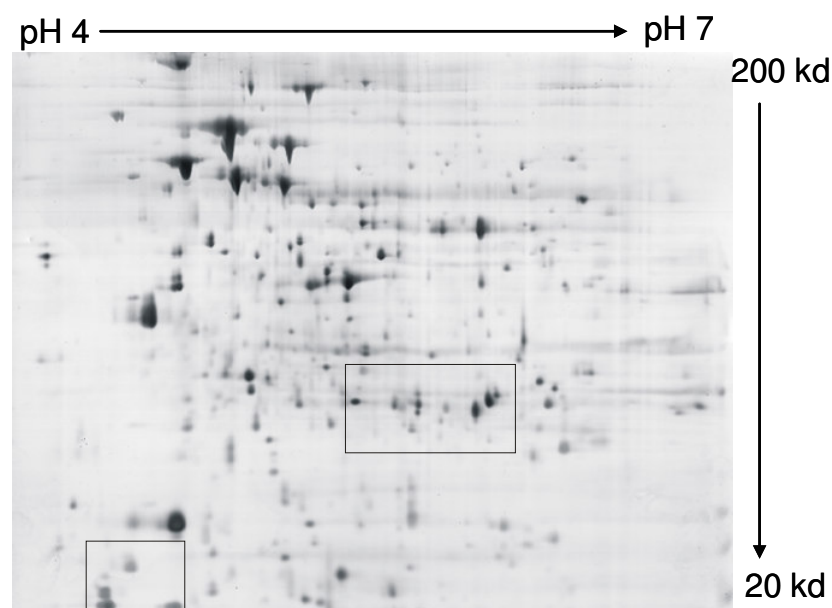


Abbildung 3.1: Diese Abbildung zeigt exemplarisch ein Silber-gefärbtes Gel. Die Zellen wurden bei 10°C angezogen. Die geladene Proteinmenge betrug 50 µg, der pH Bereich erstreckte sich von pH 4 bis pH 7. Durch Einrahmung sind Bereiche hervorgehoben in denen sich regulierte Spots finden. Diese wurden in SYPRO™ Ruby-gefärbten Gelen quantitativ untersucht (siehe Abbildung 3.2)

Abbildung 3.1 zeigt ein Silber-gefärbtes Gel eines Proteinextrakts von an 10°C angepassten Zellen. Die Proteinmuster weisen bei den drei verschiedenen Wachstumstemperaturen wenige Unterschiede auf. Eine starke Hochregulierung

bestimmter Proteine bei tiefen Temperaturen, wie dies bei anderen Organismen der Fall ist, konnte hier nicht beobachtet werden. Es wurden allerdings zwei Proteine gefunden, die bei tieferen Temperaturen mit geringerer Abundanz vorhanden waren. Sie befinden sich in den, in Abbildung 3.1 eingerahmten Bereichen. Um das Ausmaß der Regulation der beiden Proteinspots zu quantifizieren, wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO™ Ruby-gefärbte Gele untersucht.

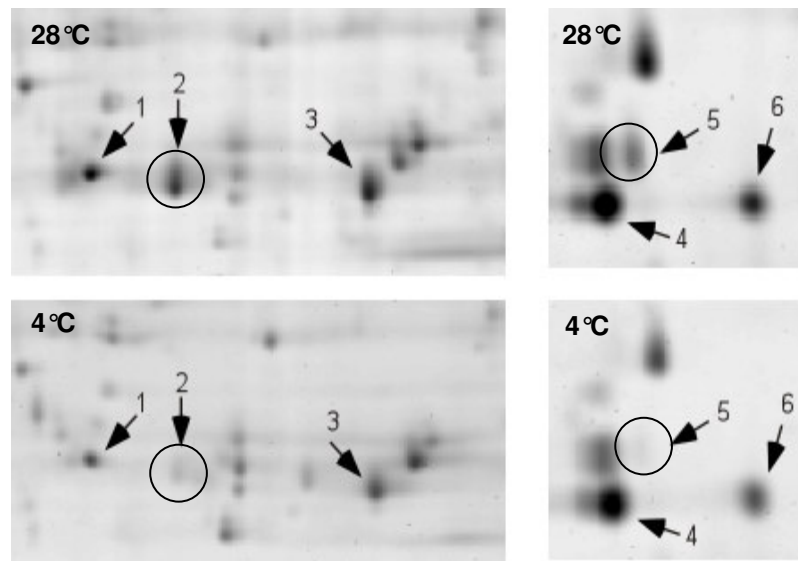


Abbildung 3.2: Detailansichten von SYPRO™ Ruby-gefärbten Gelen gezeigt. Die Wachstumstemperatur für die Zellen betrug 28 und 4°C. Die geladene Proteinmenge betrug 200 µg und der pH-Bereich erstreckte sich von pH 4 bis 7. Die hier gezeigten Ausschnitte entsprechen den hervorgehobenen Bereichen aus Abbildung 3.1. Spots 2 und 5 zeigen deutliche Abundanzunterschiede, die restlichen mit Nummern markierten Proteinspots dienen als Referenzen bei der Quantifizierung.

Abbildung 3.2 zeigt Ausschnittvergrößerungen von mit SYPRO™ Ruby-gefärbten Gelen, die den eingerahmten Bereichen aus Abbildung 3.2 entsprechen. In diesen Kästen befinden sich die regulierten Spots (Spot 2 und 5). Die restlichen mit Nummern markierten Spots dienen als Vergleich bei der Quantifizierung (siehe Tabelle 3.1). Ein Vergleich zwischen Zellen, die bei 28 oder bei 4°C inkubiert wurden, zeigte einen 11,07 (Spot 2) bzw. 4,82 (Spot 5) -fachen Unterschied in der Abundanz.

Für die Referenzspots ergeben sich Verhältnisse von 0,60 bis 1,13, während die Ratios für die als reguliert betrachteten Spots deutlich höher lagen.

Tabelle 3.1: Proteinmengen bzw. relative Abundanzunterschiede (Ratios) in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur (28 oder 4°C)

Protein Spot ^{a)}	Proteinmenge pro Spot [µg]		Ratio
	28°C	4°C	
1	1,07	0,95	1,13
2	1,66	0,15	11,07
3	1,69	2,46	0,69
4	2,33	3,89	0,60
5	0,53	0,11	4,82
6	1,07	1,56	0,66

a) Nummerierung entspricht der in Abb. 3.2 verwendeten

Es wurden außerdem mit Coomassie gefärbte Gele von Zellen, die bei 28°C gewachsen waren, angefertigt. Die Proteinspots 1 bis 6 wurden ausgestochen und durch Edmann-Sequenzierung analysiert. Die erhaltenen N-terminalen Sequenzen wurden mit den vorhandenen Genomdaten von *Db. autotrophicum* verglichen. Die Ergebnisse der nachfolgenden bioinformatischen Auswertung sind in Tabelle 3.2 aufgeführt, wobei differenzielle Proteinspots durch Fettdruck hervorgehoben sind. Für die Spots 2, 3 und 6 konnten korrespondierende ORFs auf dem Genom identifiziert werden. Bei den Spots 1, 4 und 5 war dies nicht möglich. Die Funktionsvorhersage erfolgte anhand von BLAST Suchen in den Datenbanken.

Tabelle 3.2 Identifizierung der ausgestochenen Proteinspots.

Spot ^{a)}	ORF	Funktion	Sequenz
1	n.n ^{b)}	n.n ^{b)}	AAGAGYAIIGHSER
2	gdawp42f/C131_0684	Peroxiredoxin	FPIVAANDSVAMK
3	gdaia23f.esd/C25_0041	Serin Zyklus Enzym (Fragment)	EEMTQILLEDGK und DFIDVLASK
4	n.n ^{b)}	n.n ^{b)}	n.n ^{b)}
5	n.n^{b)}	n.n^{b)}	n.n^{b)}
6	bdard56f/C6_0285	Thioredoxin	VNVDENPVTPSK

a) Nummerierung entspricht der in Abb.3.2 verwendeten

b) nicht nachgewiesen

Bei Spot 2, dem am stärksten regulierten Protein, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Peroxiredoxin. Peroxiredoxine sind Enzyme mit antioxidativer Aktivität. Ihnen wird bei Bakterien eine Rolle bei der Detoxifikation von organischen Hydroperoxiden und Wasserstoffperoxid zugeschrieben. Peroxiredoxine sind ubiquitär verbreitete Proteine (Wood et al. 2003). Bei *E. coli* gehören sie zu den zehn häufigsten Zellproteinen (Link et al. 1997). Für Spot 1 konnte zwar eine Edmann-Sequenz generiert werden, eine Zuordnung zu einem ORF war jedoch nicht möglich. Für Spot 4 und 5 konnte keine Edmann-Sequenz erhalten werden.

Im Genom von *Db. autotrophicum* konnten auch 7 Gene für Cold Shock Proteine vorhergesagt werden. Diese sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. Es handelt sich überwiegend um kleine Proteine, die auf Grund ihrer geringen Größe nicht oder nur schlecht unter den gewählten 2DE Bedingungen aufgetrennt werden könnten. Mit zwei Ausnahmen liegt der isoelektrische Punkt in dem durch die verwendeten IPG-Streifen abgedeckten Bereich. Daher ist es nicht überraschend, dass diese Proteine anhand von Abundanzunterschieden nicht zu erkennen waren.

Tabelle 3.3 Cold Shock Proteine im Genom von *Db. autotrophicum*

ORF	Funktion	pI	MW [kDa]
ada3730pcr1564/C42_0421	Cold Shock DNA Bindedomäne	10,96	24,05
ada3730pcr1564/C42_0014	Cold Shock Domäne	5,48	10,56
gay31r.esd/C92_0038	Cold Shock Protein	10,48	24,04
baah03r/C142_0190	Cold Shock Protein D	4,92	9,41
baag03r/C142_0173	Cold Shock DNA Bindedomäne	4,89	7,22
gdayo28r/C119_0189	Cold Shock Domäne	4,91	7,14
ga2bq55f/C93_0001	Cold Shock Protein L	4,59	7,10

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Anpassung an Kälte bei *Db. autotrophicum* keine spezielle Enzymausstattung zu erfordern scheint. Es konnten nur zwei Proteine als differenziell nachgewiesen werden, sie sind bei höheren Temperaturen um den Faktor 11,07 bzw. 4,82 häufiger. Bei einem von ihnen handelt es sich um ein Peroxiredoxin.

3.2 Regulation des Abbaus von Alkoholen in *Desulfobacterium autotrophicum*

Da *Db. autotrophicum* in der Lage ist eine Vielzahl von Verbindungen als Wachstumssubstrat zu verwerten, stellte sich auch die Frage nach Regulation und Anpassung an das Vorhandensein verschiedener Substrate. Der Abbau von alkoholischen Substraten wurde im Vergleich zum Abbau von Laktat und zum autotrophen Wachstum näher untersucht. Dabei wurden drei experimentelle Vorgehensweisen verfolgt. Zunächst wurde in physiologischen Versuchen das prinzipielle Vorkommen regulatorischer Prozesse *in vivo* nachgewiesen. Anschließend wurden sie auf Protein- (2DE) und RNA-Ebene (Real Time RT-PCR) eingehender untersucht.

3.2.1 Physiologische Versuche

3.2.1.1 Zellsuspensionsversuche

(Durchführung: D. Lange)

Zellsuspensionen autotroph (H_2/CO_2) gewachsener Zellen wurden mit verschiedenen Substraten (Laktat, Ethanol, 1-Propanol und 1-Butanol) versetzt. Als Negativkontrolle diente eine Zellsuspension ohne Substrat. Die Sulfidbildung diente als indirekter Nachweis metabolischer Aktivität, d.h. für die Verwertung der Substrate.

Wie in Abbildung 3.3 zu sehen ist, sind an autotrophes Wachstum angepasste Zellen sofort in der Lage Laktat als Substrat zu verwerten. Dagegen wurden die alkoholischen Substrate erst nach einer Lag Phase von mindestens zwei Stunden verwertet. Dieser Befund deutete darauf hin, dass für die Fähigkeit zur Verwertung von Alkoholen induziert werden musste.

Zur genaueren physiologischen Untersuchung dieses Regulationsvorgangs wurden weitere Zellsuspensionsversuche durchgeführt. Dabei wurden Zellen eingesetzt, die jeweils an das Wachstum mit einem der drei Alkohole angepasst waren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 B bis D dargestellt.

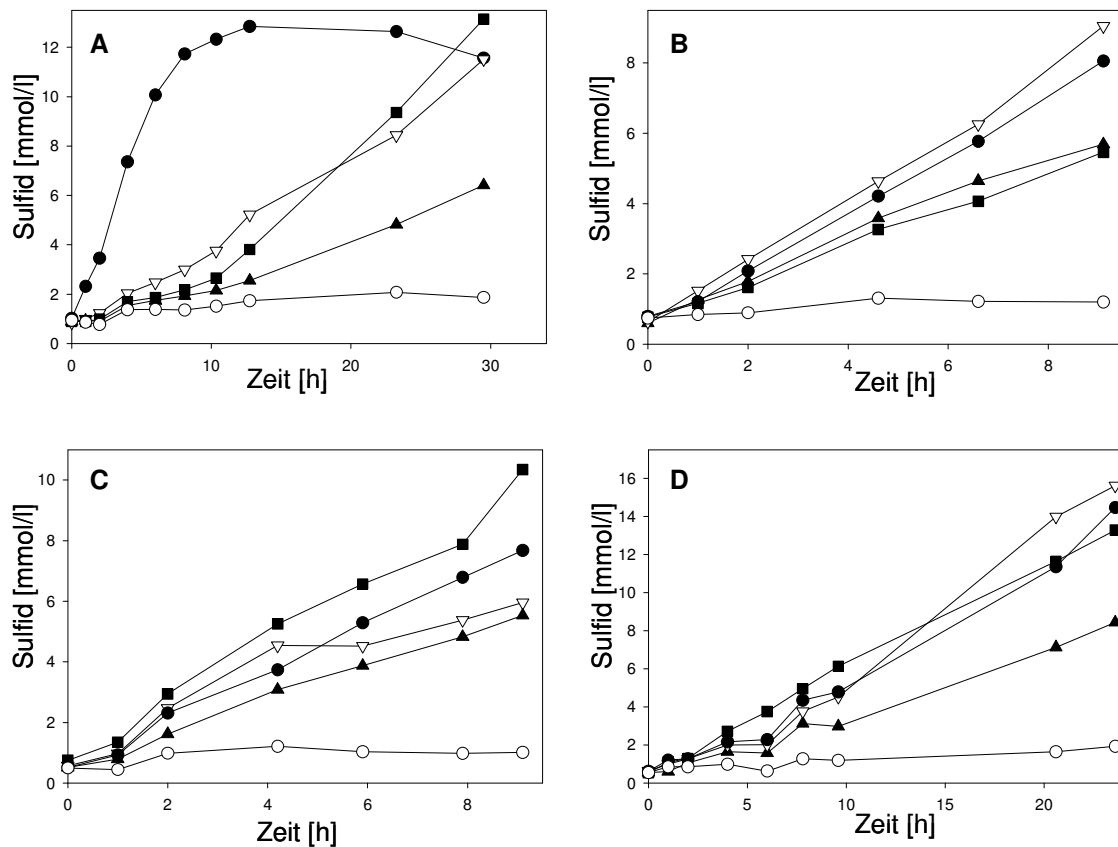


Abbildung 3.3 : Adaptionsstudien mit dichten Suspensionen von *Db. autotrophicum*. Die Suspensionen wurden mit verschiedenen Substraten supplementiert: Laktat (●), Ethanol (▲), 1-Propanol (▽), und 1-Butanol (■). Ein Ansatz ohne Substrat diente als Negativkontrolle (○). Die Zellen waren zuvor an das Wachstum mit H_2/CO_2 (A), Ethanol (B), 1-Propanol (C) und 1-Butanol (D) angepasst.

Die Zellen sind sofort in der Lage alle drei Alkohole (Ethanol, 1-Propanol oder 1-Butanol) zu verwerten, unabhängig davon welcher von ihnen als Anpassungssubstrat verwendet worden war. Diese Befunde gaben einen ersten Hinweis darauf, dass eine einzige Alkohol-Dehydrogenase alle Alkohole umsetzt. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden im Verlauf der Arbeit entsprechende Versuche auf Proteinebene durchgeführt. (siehe Abschnitt: 3.2.2).

3.2.1.2 Wachstumsversuche

Im Fall des Abbaus von 1-Propanol wurden in der Folge weitere Wachstumsexperimente durchgeführt, um zu prüfen ob (i) die Verwertung von 1-Propanol durch das gleichzeitige Vorliegen von Laktat und (ii) die intermediäre Ausscheidung von Propionat durch die eingesetzte Konzentration von 1-Propanol beeinflusst wird.

Zu (i): Als Maß für das Wachstum mit dem äquimolaren (je 10 mmol/l) Gemisch aus Laktat und 1-Propanol diente die optische Dichte bei 660 nm. Zu jedem Probenahmezeitpunkt wurden die Konzentrationen an Laktat, Acetat, 1-Propanol und Propionat (siehe Abbildung 3.4) bestimmt.

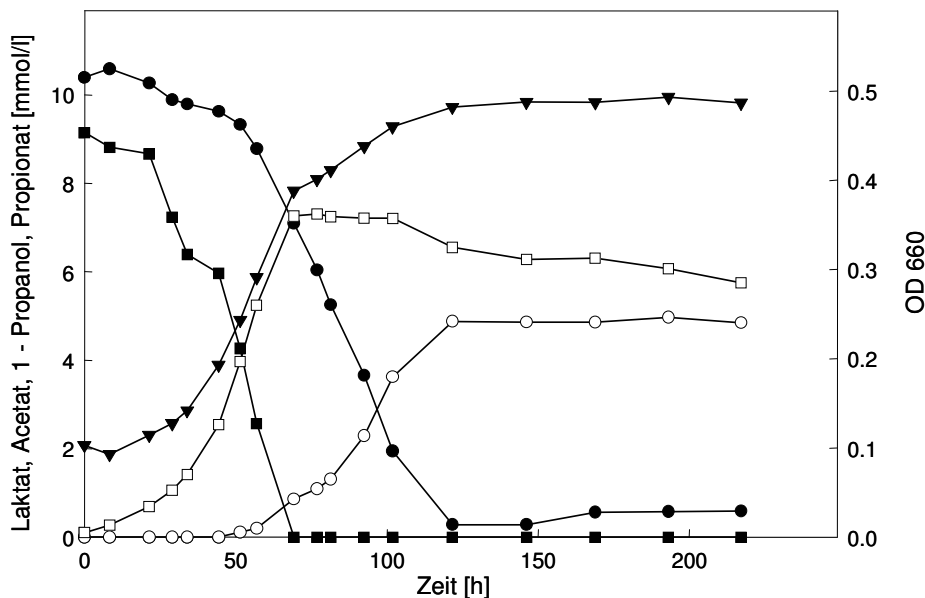


Abbildung 3.4: Wachstum von *Desulfobacterium autotrophicum* mit einem äquimolaren Gemisch aus Laktat und 1-Propanol. Die Zellen waren mit Laktat und 1-Propanol vorkultiviert. Während des Wachstums wurden folgende Parameter bestimmt: die OD 660, Laktat (●), Acetat (○), 1-Propanol (■) und Propionat (□) gegen die Zeit. Bei den Datenpunkten handelt es sich um Durchschnittswerte aus zwei Parallelansätzen. Die Ergebnisse konnten in einem unabhängigen Experiment reproduziert werden.

Laktat und Propanol wurden gleichzeitig verwertet, d.h. keines der beiden Substrate unterdrückte die Verwertung des anderen. Die Verwertung von 1-Propanol ist nicht unterdrückt. 1-Propanol wurde mit einer höheren Rate abgebaut als Laktat und war somit zu einem früheren Zeitpunkt verbraucht. Während des Verbrauchs von Laktat und 1-Propanol wurden Acetat und Propionat ausgeschieden. Die Wiederaufnahme und Verwertung von Propionat setzte ein, sobald Laktat aufgebraucht war. Mit dem völligen Verbrauch von Laktat ging der Übergang in die stationäre Phase einher. Die optische Dichte blieb ab diesem Zeitpunkt konstant, während die Sulfidkonzentration noch bis zum Inkubationsende zunahm, d.h. die Zellen blieben metabolisch aktiv. In einem weiteren Experiment mit Laktat (20 mmol/l) bzw. 1-Propanol (20 mmol/l) als Wachstumssubstrat war ebenfalls eine Bildung von Acetat bzw. Propionat zu beobachten. Sowohl im Falle von Acetat als auch bei Propionat ist eine erneute Abnahme zu beobachten, wobei dieser Effekt im Falle von Propionat deutlicher ausgeprägt war (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3.4 zeigt, dass *Db. autotrophicum* mit einem Gemisch aus Laktat und 1-Propanol schneller wächst (Verdopplungszeit $t_d = 1,03$) als alleine mit Laktat (Verdopplungszeit $t_d = 1,42$). An den ebenfalls in Tabelle 3.4 aufgeführten Verhältnissen von Laktat zu Acetat und von 1-Propanol zu Propionat lässt sich ablesen, dass die Bakterien einen Teil des Substrats endoxidieren bzw. zum Aufbau von Zellmasse verwenden, da das jeweilige Verhältnis nicht 1:1 ist.

Tabelle 3.4 Verdopplungszeiten und Verhältnisse von Laktat zu Acetat bzw. von 1-Propanol zu Propionat

Substrat	t_d [Tage]	[Laktat]:[Acetat] ^a	[1-Propanol]:[Propionat] ^a
Laktat	1,42	1,8 : 1	
1-Propanol	1,28		1,4 : 1
Laktat + 1-Propanol	1,03	2,2 : 1	1,4 : 1

a) Die Verhältnisse wurden mit den Ausgangskonzentrationen von Laktat bzw. 1-Propanol und jeweils höchsten Konzentrationen an Acetat bzw. Propionat berechnet

Zu (ii): Wachstumsversuche mit verschiedenen Konzentrationen von 1-Propanol sollten zeigen, ob das ausgeschiedene Propionat wieder vollständig verbraucht wird und bei welcher Konzentration an 1-Propanol dies der Fall ist. Es wurde zwischen 5 und 25 mmol/l 1-Propanol eingesetzt. Abbildung 3.5 zeigt deutlich die Abhängigkeit der maximal erreichten optischen Dichte von der eingesetzten Menge an Substrat. Je höher diese ist, desto höher ist auch die optische Dichte die erreicht wird. Dieser Anstieg ist allerdings nicht proportional zur eingesetzten Substratkonzentration. So war die maximal erreichte Zelldichte bei der niedrigsten Substratkonzentration (5 mmol/l) nur halb so hoch wie bei der höchsten (25 mmol/l). Ein Vergleich mit den gemessenen Substratkonzentrationen zeigte, dass bei Eintritt in die stationäre Phase 1-Propanol in allen vier Fällen verbraucht war. Das ausgeschiedene Propionat führt von diesem Zeitpunkt an in keinem der Fälle zu einer weiteren Zunahme der Optischen Dichte, obwohl es durchaus verwertet wird. Vermutlich dient es dem Erhaltungsstoffwechsel. Wachstumsversuche nur mit Propionat als Substrat zeigten, dass hier kaum Wachstum stattfindet, d.h. die Zunahme der optischen Dichte ist nur minimal.

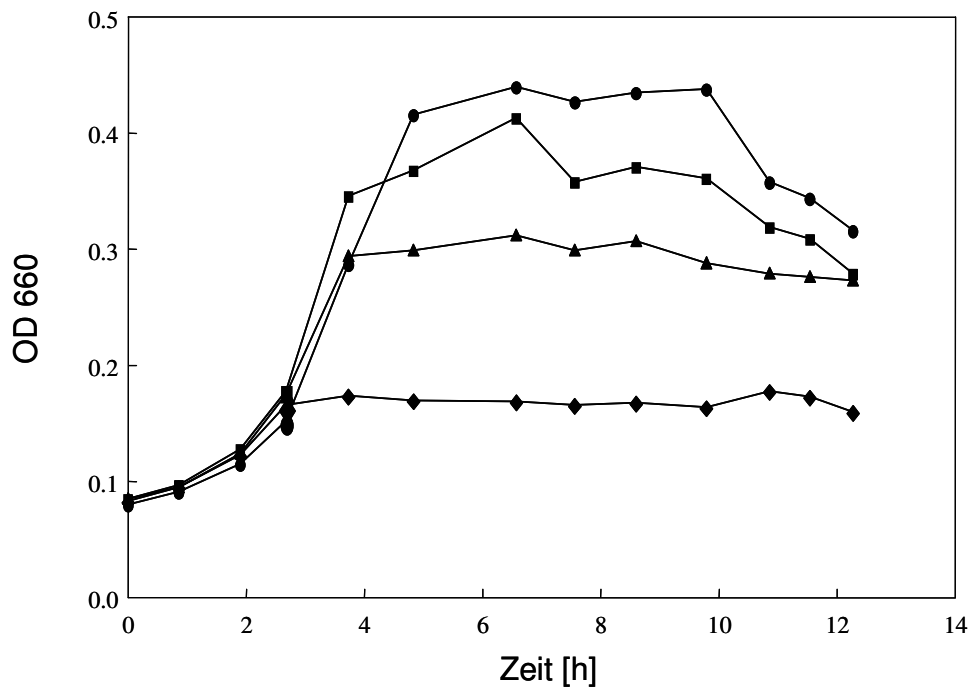


Abbildung 3.5: Wachstum von *Desulfobacterium autotrophicum* bei verschiedenen Konzentrationen von 1-Propanol: 5 mmol/l (◆), 15 mmol/l (▲), 20 mmol/l (■) und 25 mmol/l (●).

Die Verwertung von ausgeschiedenem Propionat wird in Tabelle 3.5 deutlich. Im Falle der geringsten Konzentration an 1-Propanol (5 mmol/l) ist dieser Abbau vollständig, denn es war bei Inkubationsende kein Propionat mehr nachweisbar.

Tabelle 3.5 Verhältnisse von 1-Propanol zu Propionat

1-Propanol [mmol/l]	[1-Propanol] : [Propionat] ^c		t _d
	Verhältnis ^a	Verhältnis ^b	
5	1,32 : 1	1,00 : 0	1,78
15	1,64 : 1	7,28 : 1	1,47
20	1,84 : 1	3,48 : 1	1,26
25	1,53 : 1	2,5 : 1	1,37

^a Die Ratio wurde mit der Ausgangskonzentration von 1-Propanol und mit der Propionatkonzentration zum Zeitpunkt des vollständigen Verbrauchs von 1-Propanol berechnet.

^b Die Ration wurde mit der Ausgangskonzentration von 1-Propanol und der Propionatkonzentration am Ende der Inkubation berechnet.

Db. autotrophicum ist in der Lage, die Verwertung von Alkoholen zu regulieren. Das Vorhandensein von Laktat unterdrückte jedoch nicht die Verwertung der alkoholischen Substrate. Vielmehr konnten Laktat und 1-Propanol gleichzeitig abgebaut werden, wobei

Acetat und Propionat ausgeschieden wurden. Eine erneute Aufnahme und vollständige Oxidation dieser Substrate ist zu vermuten. Im Falle von Propionat wurde jedoch beobachtet, dass ein Wachstum, im Sinne einer Zunahme der Zelldichte, nicht stattfand.

3.2.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

3.2.2.1 3.2.2.1 2D-Gele (Silber-Färbung)

Die im Nachfolgenden beschriebenen proteomischen Experimente wurden in Fortsetzung der unter 3.2.1.1 beschriebenen physiologischen Experimente durchgeführt. Proteinextrakte von Zellen, die an das Wachstum mit Laktat (10 mmol/l), Ethanol (10 mmol/l), 1-Propanol (10 mmol/l), 1-Butanol (5 mmol/l), einer Mischung aus Laktat (10 mmol/l) und 1-Propanol (10 mmol/l) bzw. H_2/CO_2 angepasst waren, wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 3.6 zeigt exemplarisch ein Silber-gefärbtes 2DE Gel von „Ethanol angepassten“ Zellen. Für die isoelektrische Fokussierung wurden ein pH-Bereich von pH 4 bis pH 7 und 50 μ g Protein eingesetzt. In Abbildung 3.6 ist deutlich zu erkennen, dass drei Proteinspots in „Alkohol-adaptierten“ Zellen spezifisch und abundant waren, während sie in den Anzuchten mit Laktat bzw. H_2/CO_2 fehlten. Der Gelbereich in dem sich diese Spots befinden, ist in Abbildung 3.6 durch Einrahmung hervorgehoben und entspricht den Ausschnitten aus Abbildung 3.7.

Es wurden weitere Gele mit einem engeren pH-Bereich (pH 5 bis 6) von Zellextrakten mit Ethanol, 1-Propanol und 1-Butanol adaptierten Zellen angefertigt. Unter diesen Bedingungen ließen sich die für die drei alkoholischen Substrate spezifischen Spots (7, 8 und 10) vollständig voneinander trennen. Dies war bei einer IEF mit breitem pH-Bereich nicht immer möglich.

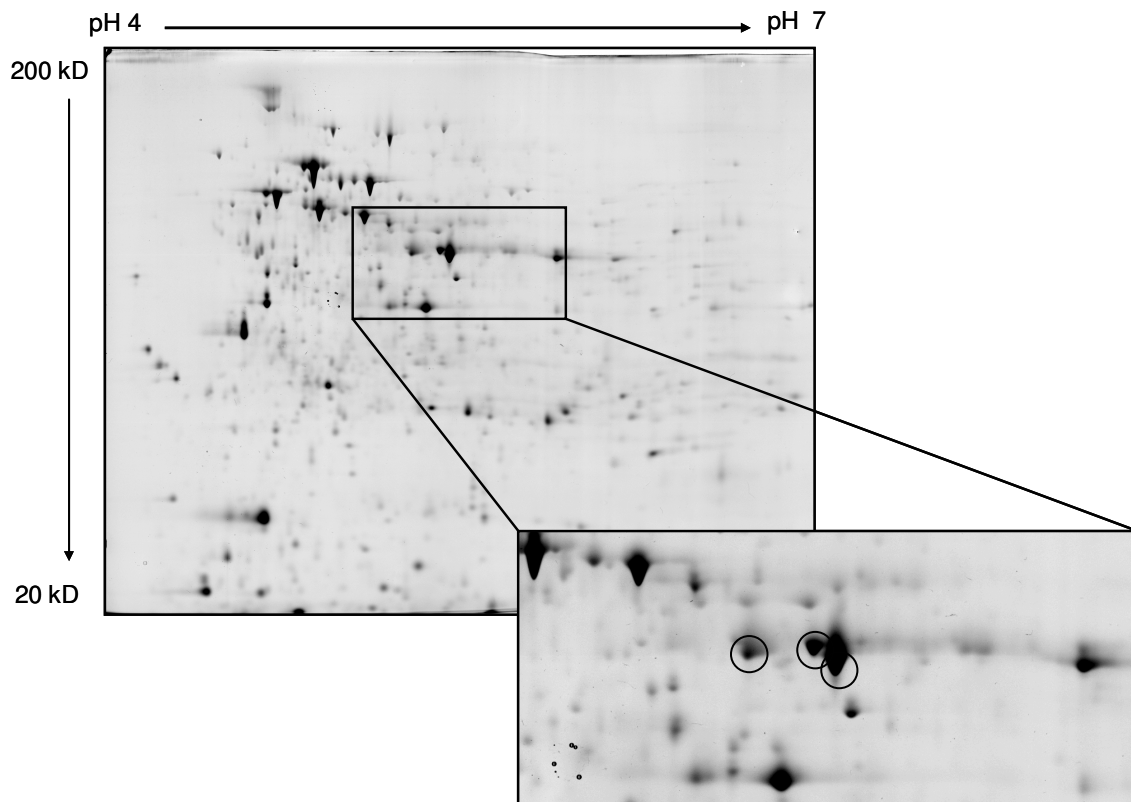


Abbildung 3.6: Silber-gefärbtes 2DE-Gel von „Etanol-adaptierten“ Zellen. Die IEF wurde in einem pH-Bereich von 4 – 7 durchgeführt. Im eingerahmten Bereich sind drei Proteine hervorgehoben (Kreise), die in den Anzuchten mit Laktat oder H_2/CO_2 fehlten.

3.2.2.2 Quantifizierung relativer Proteinhäufigkeit mit SYPRO™ Ruby

Um die differenzielle Bildung der Proteinspots genauer zu quantifizieren wurden 2DE Gele (pH 4 - 7) von allen Wachstumszuständen mit SYPRO™ Ruby gefärbt. Die eingesetzte Proteinmenge betrug pro Gel 200 μ g. In Abbildung 3.7 sind die Detailansichten dieser Gele gezeigt. Die quantifizierten Spots sind mit Pfeilen hervorgehoben: rote Pfeile weisen auf differenziell exprimierte Proteine hin, schwarze Pfeile bezeichnen Spots, die als Referenz bei der Quantifizierung herangezogen wurden.

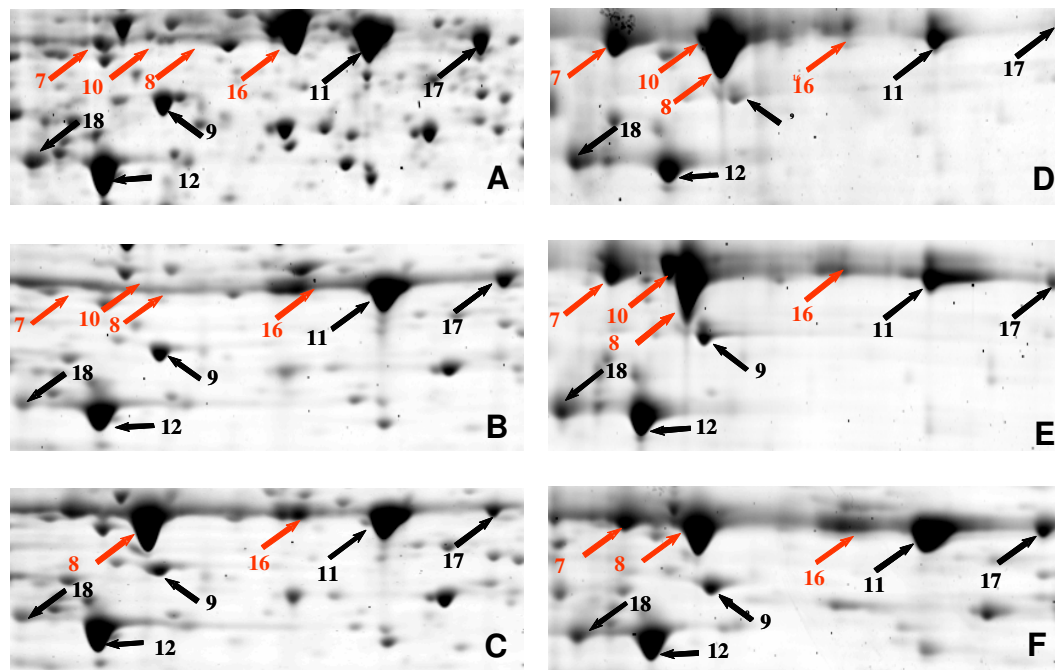


Abbildung 3.7 Detailansichten SYPRO™ Ruby-gefärbter Gele. Der pH-Bereich der isoelektrischen Fokussierung war 4 – 7, die eingesetzte Proteinmenge betrug 200 µg. Zellextrakte aus Zellen, die mit H₂/CO₂ (A), Laktat (B), einem Gemisch aus Laktat und 1-Propanol (C), Ethanol (D), 1-Propanol (E) und 1-Butanol (F) gewachsen waren, wurden analysiert. Die Ausschnitte entsprechen dem eingekreisten Bereich aus Abbildung 3.7. Rote Pfeile markieren differenziell gebildete Proteine, schwarze Pfeile Spots mit kaum veränderter Abundanz.

Wie in Abbildung 3.7 und Tabelle 3.6 zu erkennen ist, waren bis zu drei Proteine (Spot 7, 8 und 10) beim Wachstum mit alkoholischen Substraten um den Faktor 3,2 (Spot 7, Wachstum mit Butanol) bis 41,11 (Spot 8, Wachstum mit Ethanol) hochreguliert. Die Häufigkeit der Spots 7 und 8 ist beim Wachstum mit Ethanol höher als im Fall von 1-Propanol und 1-Butanol. Beim Wachstum mit 1-Propanol und Laktat konnte Spot 8 detektiert werden, nicht aber Spot 7 und 10. Spot 8 ist hier auch weniger häufig als beim Wachstum mit den anderen beiden Alkoholen. Spot 10 konnte nur bei mit Ethanol oder Propanol gewachsenen Zellen aufgelöst werden. Er ist in „Propanol-adaptierten“ Zellen um den Faktor 7,23 und bei „Ethanol-adaptierten“ Zellen um den Faktor 3,19 häufiger als in „H₂/CO₂-adaptierten Zellen“. Beim autotrophen Wachstum erwies sich ein weiteres Protein (Spot 16) als differenziell gebildet, es scheint bei heterotrophen Wachstum weniger abundant zu sein.

Tabelle 3.6 Proteinmengen bzw. relative Abundanzunterschiede (Ratio) in Abhängigkeit vom Wachstumssubstrat. Spot 7,8 und 10 (Fettdruck) sind, bei Wachstum mit einem alkoholischen Substrat deutlich hoch reguliert. Spot 16 (Kursivdruck) ist bei heterotrophen Wachstum leicht herunter reguliert. Die restlichen Spots dienen als Vergleich. Die Kalkulation der Proteinmenge basiert auf der Annahme, dass die Gesamtintensität aller Spots der Beladungsmenge von 200 µg entspricht.

Spot	H ₂ /CO ₂	Laktat		Ethanol		1 - Propanol		1 - Butanol		Laktat + 1 - Propanol	
	µg/spot	µg/spot	Verhältnis	µg/spot	Verhältnis	µg/spot	Verhältnis	µg/spot	Verhältnis	µg/spot	Verhältnis
7	0,45	0,35	0,78	3,88	8,62	2,84	6,31	1,44	3,2	n.n	n.n
8	0,02	0,26	0,96	11,10	41,11	9,32	34,52	6,93	25,67	5,59	20,7
9	1,24	1,60	1,12	0,50	0,35	1,69	1,18	0,80	0,56	0,55	0,38
10	1,43	0,18	1,93	0,99	3,19	2,24	7,23	n.n	n.n	n.n	n.n
11	4,09	7,91	1,93	2,97	0,73	3,02	0,74	7,81	1,91	5,44	1,33
12	4,01	5,99	1,49	3,69	0,92	4,50	1,12	5,73	1,43	4,03	1,00
<i>16</i>	3,69	1,18	<i>0,32</i>	0,62	<i>0,17</i>	0,55	0,15	1,45	<i>0,39</i>	1,44	<i>0,39</i>
17	0,79	0,51	0,65	2,08	2,63	2,22	2,81	1,01	1,28	0,37	0,47
18	1,23	1,26	1,02	0,41	0,33	0,93	0,76	1,39	1,13	0,66	0,54

3.2.2.3 Proteinidentifizierung

Um die differenziell gebildeten Proteine zu identifizieren, wurden Coomassie Gele (pH 4 – 7) mit einer Proteinladung von 400 µg bis 600 µg angefertigt. Je zwei differenziell exprimierte Proteinspots (Spot 7 und 8) wurden manuell ausgestochen und mit MALDI-TOF MS (Peptidmassenfingerprint) analysiert. Spot 7 wurde zusätzlich Edmann sequenziert.

Aus den PMF Daten (Tabelle 3.7) ist ersichtlich, dass es sich bei den zwei Proteinspots unter allen Wachstumszuständen um das gleiche Protein handelt. *Db autotrophicum* verwendet also eine einzige Alkohol-Dehydrogenase für den Abbau aller drei getesteten Alkohole. Tabelle 3.7 zeigt eine Auswahl an experimentell bestimmten Peptidmassen (Exp. Masse) für Spot 7 und Spot 8 für jeden Wachstumszustand. Ebenfalls in der Tabelle angegeben sind die theoretischen Massen, sowie die Position des entsprechenden Peptids im Protein. Die geringen Abweichungen (Δ Da) zwischen experimentellen und theoretischen Peptidmassen belegen die Sicherheit der Identifizierung. Dementsprechend handelt es sich bei Spot 7 und 8 um das gleiche Protein, auch wenn sie sich im Hinblick auf den isoelektrischen Punkt unterscheiden. Dies könnte auf eine posttranslationale Modifikation wie z.B. Phosphorylierung zurückzuführen sein. Mit Hilfe des PMF, sowie mit einer internen Edmann-Sequenz konnte eindeutig ein offener Leserahmen in den bisher vorhandenen Teilsequenzen des Genoms von *Db. autotrophicum* identifiziert werden.

Tabelle 3.7: Darstellung der massenspektrometrischen Daten für ausgewählte tryptische Peptide von Spots 7 und 8. Pro Peptid ist die Position in der Gesamtsequenz der identifizierten Alkohol-Dehydrogenase, sowie seine theoretische Masse angegeben. Pro Wachstumszustand sind die experimentell bestimmten Peptidmassen und die Abweichung (Δ Da) von der theoretisch berechneten Masse aufgeführt. Das Peptid auf dem die interne Edmann-Sequenz basiert ist durch Fettdruck hervorgehoben.

Spot	Position (des Peptids in der ADH)	Theor. Masse	Substrat							
			Ethanol		1 - Propanol		1 - Butanol		Laktat + 1 - Propanol	
			Exp.Masse	Δ Da	Exp.Masse	Δ Da	Exp.Masse	Δ Da	Exp.Masse	Δ Da
7	32 – 44	1360,784	1360,752	-0,032	1360,789	+0,005	1360,784	0,000	n.n ^{a)}	n.n ^{a)}
8			1360,825	+0,041	1360,776	-0,008	1360,777	-0,007	1360,931	+0,147
7	81 – 91	1178,606	1178,578	-0,028	1178,612	+0,006	1178,599	-0,007	n.n ^{a)}	n.n ^{a)}
8			1178,651	+0,045	1178,602	-0,004	1178,590	-0,016	1178,722	+0,116
7	154 – 162	1112,541	1112,535	-0,006	1112,555	+0,014	1112,558	+0,017	n.n ^{a)}	n.n ^{a)}
8			1112,610	+0,069	1112,548	-0,007	1112,554	+0,013	1112,666	+0,125
7	234 – 245	1200,597	1200,600	+0,003	1200,611	+0,014	1200,626	+0,029	n.n ^{a)}	n.n ^{a)}
8			1200,664	+0,067	1200,602	+0,005	1200,613	+0,016	1200,731	+0,134
7	328 – 351	2395,354	2395,280	-0,065	2395,327	-0,018	2395,370	+0,025	n.n ^{a)}	n.n ^{a)}
8			2395,345	0,000	2395,250	+0,005	2395,395	+0,050	1395,637	+0,292

a) n.n: nicht nachgewiesen

3.2.3 Bioinformatische Analyse der Alkohol-Dehydrogenase

3.2.3.1 Genomischer Kontext des identifizierten *adh* Gens

Der identifizierte offene Leserahmen (ORF) kodiert für eine eisenabhängige Alkohol-Dehydrogenase (ADH), die höchste Sequenzähnlichkeit zur ADH II von *Zymomonas mobilis* zeigt. Abbildung 3.8 veranschaulicht die unmittelbare genetische Umgebung des identifizierten *adh* Gens.

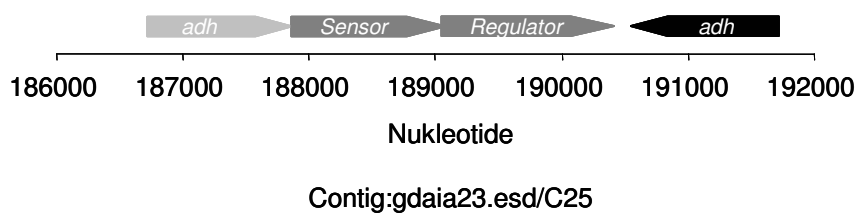


Abbildung 3.8 Gezeigt ist die identifizierte Alkohol-Dehydrogenase (schwarz) von *Db. autotrophicum*. Unmittelbar downstream befinden sich, in gegenläufiger Leserichtung, zwei Gene für ein 2-Komponenten-Regulationssystem (dunkles Grau): ein Response Regulator und eine Sensor Histidin Kinase. Daneben konnte ein ORF, der für eine weitere Alkohol-Dehydrogenase kodiert, identifiziert werden.

In nächster Umgebung des identifizierten *adh* Gens befinden sich Gene für ein Zwei-Komponenten-Regulationssystem: ein Response Regulator und eine Sensor Histidin Kinase. Sie sind, relativ zum *adh* Gen, in gegenläufiger Richtung auf dem Genom orientiert. Außerdem konnte noch ein weiteres *adh* Gen identifiziert werden. Es handelt sich hier ebenfalls um eine eisenabhängige Alkohol-Dehydrogenase, die große Ähnlichkeit zu einer Methanol-Dehydrogenase zeigt. Das folgende Bindemotiv für Eisen stellt einen Marker für die Klasse der eisenabhängigen Alkohol-Dehydrogenasen dar: **GXXHXXAHXXGXXXXXPHG** (Daniel et al. 1995). Dieses Sequenzmotiv konnte auch im identifizierten *adh* Gen gefunden werden (Position 175 – 194).

3.2.3.2 Gene für Alkohol-Dehydrogenasen bei verschiedenen Sulfatreduzierern – Phylogenie

Auf dem Genom von *Db. autotrophicum* konnte noch eine ganze Reihe weiterer Gene für Alkohol-Dehydrogenasen identifiziert werden. Auch die Genomdaten von *Dt. psychrophila* und *Dv. vulgaris* wurden, soweit vorhanden, auf das Vorkommen solcher Gene überprüft. Tabelle 3.7 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 3.7 Auflistung der in den Genomen von *Db. autotrophicum*, *Dt. psychrophila* und *Dv. vulgaris* gefundenen Gene, die für ADHs kodieren.

ADH-Typ	<i>Db. autotrophicum</i>	<i>Dt. psychrophila</i>	<i>Dv. vulgaris</i>
kurzkettig	5	8	5
Fe	8		
langkettig	2		
Summe	15	8	5

Alle untersuchten Organismen verfügen über mehrere ADHs. *Db. autotrophicum* besitzt die meisten und im Gegensatz zu den beiden anderen Sulfatreduzierern finden sich hier ADHs aus drei Enzymklassen, während *Dt. psychrophila* und *Dv. vulgaris* nur eisenabhängige ADHs besitzen.

Die Proteinsequenzen dieser identifizierten eisenabhängigen ADHs der drei SRB wurden einer phylogenetischen Stammbaumanalyse zugrunde gelegt (durchgeführt von Patrizia Wecker). Dieser Stammbaum ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

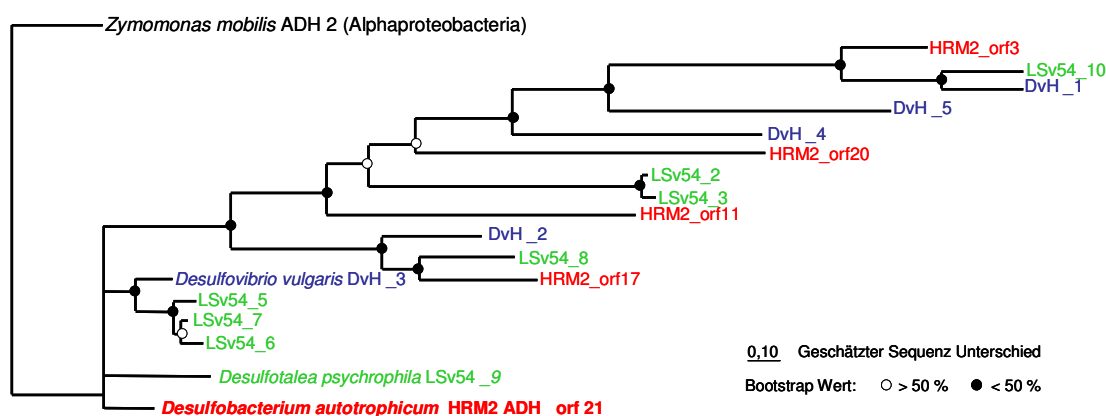


Abbildung 3.9 Phylogenetischer Stammbaum eisenabhängiger Alkohol-Dehydrogenasen von *Desulfobacterium autotrophicum* (rot), *Desulfovibrio vulgaris* (blau) und *Desulfotalea psychrophila* (grün).

Interessanterweise kommt die in dieser Arbeit identifizierte ADH_orf21 aus *Db. autotrophicum* in einem Cluster mit der ADH_DvH3 von *Dv. vulgaris* vor. Im Gegensatz zur ADH_orf21 (siehe Abschnitt 3.2.2) wird ADH_DvH3 beim Wachstum mit Laktat als abundantes Protein gebildet und in Verbindung mit dem allgemeinen Energiestoffwechsel gebraucht (Haveman et al. 2003).

3.2.4 Analyse des *adh* Gens von *Db. autotrophicum* Transkriptionsebene mittels Real-Time RT PCR

Zusätzlich zu den proteomischen Analysen (3.2.2) wurde die Expression der Alkohol-Dehydrogenase auch auf transkriptioneller Ebene untersucht. Dazu wurde ihre mRNA mit Hilfe der Real-Time RT-PCR relativ quantifiziert. Als Referenzgen zur Normalisierung diente 16SrDNA. Anzuchten mit Laktat dienten als Referenzzustand relativ zu dem das Ausmaß der Induktion der *adh* Expression bestimmt wurde. Folgende Anzuchtbedingungen wurden für die Expressionsanalyse gewählt: Wachstum mit Ethanol, 1-Propanol, 1-Butanol und einem Gemisch aus Laktat und 1-Propanol. Es handelt sich um Durchschnittswerte aus verschiedenen Real-Time PCR Experimenten und verschiedenen cDNA Synthesen mit derselben RNA Präparation. Die Wiederholungsexperimente mit RNA Präparationen paralleler Anzuchten führten im Wesentlichen zu gleichen Ergebnissen.

Im Wesentlichen stimmten die Ergebnisse der Real-Time RT-PCR mit denen der Proteomanalyse überein. Abbildung 3.10 fasst die Ergebnisse zusammen. Auch hier war die relative Expression des *adh* Gens in Anzuchten mit Ethanol am höchsten (140-fach). Am zweithöchsten war sie in Anzuchten mit 1-Butanol (73-fach) gefolgt von denen mit 1-Propanol (23-fach) und dem Substratgemisch (13-fach). Auch in Anzuchten mit Laktat konnte das *adh*-Transkript nachgewiesen werden, wenn auch nur in geringen Mengen.

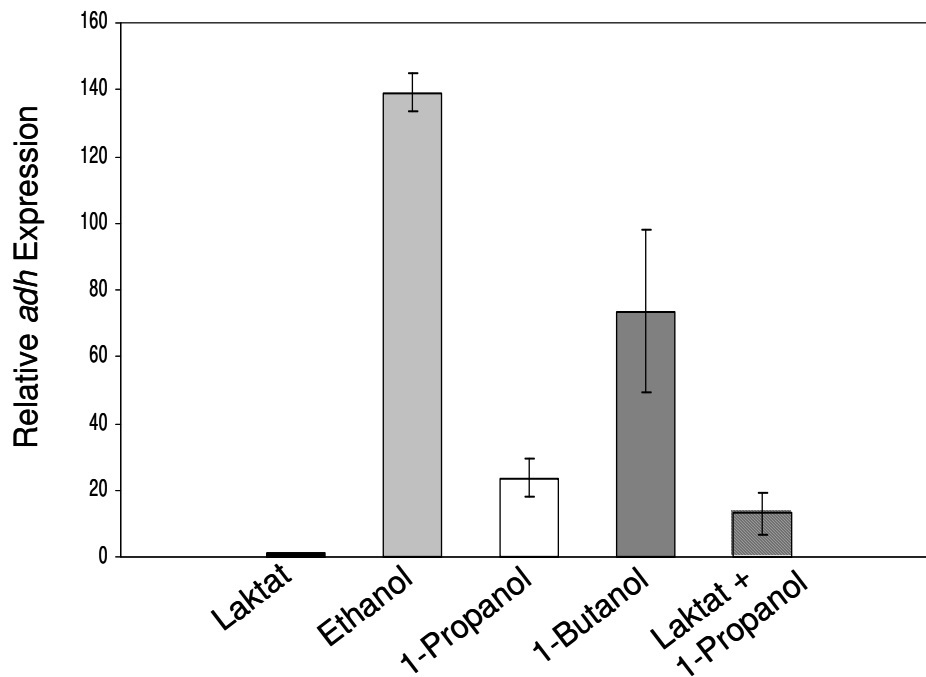


Abbildung 3.10: Relative Expression des *adh* Gens in Zellen, die an das Wachstum mit Ethanol, 1-Propanol, 1-Butanol und einem Gemisch aus Laktat und 1-Butanol angepasst waren. 16SrDNA wurde als Referenzgen und Anzuchten mit Laktat als Referenzzustand eingesetzt.

3.2.5 Vergleichende physiologisch / proteomische Analyse bei *Dv. vulgaris* und *Dt. psychrophila*

Mit *Dt. psychrophila* und *Dv. vulgaris* wurden im Hinblick auf eine mögliche Regulation Versuche mit Zellsuspensionen durchgeführt (D. Lange). Die Stämme wurden zunächst an das Wachstum mit Laktat angepasst und anschließend in Form von Zellsuspensionen mit verschiedenen Substraten (Laktat, Ethanol, 1-Propanol und 1-Butanol) supplementiert. Als Maß für metabolische Aktivität diente wiederum die gebildete Sulfidmenge. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

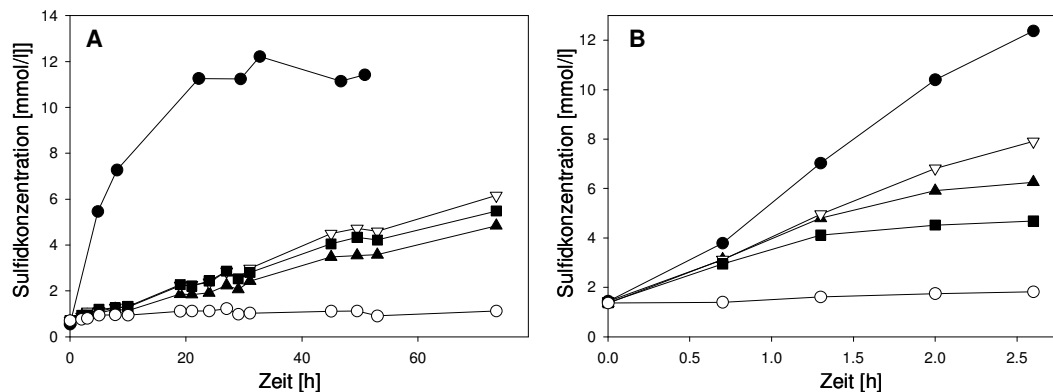


Abbildung 3.11: Adaptationsstudien mit dichten Zellsuspensionen von *Desulfotalea psychrophila* (A) und *Desulfovibrio vulgaris* (B). Die Zellen waren in beiden Fällen an das Wachstum mit Laktat angepasst. Den gewaschenen Zellsuspensionen wurde Laktat (●), Ethanol (▲), 1-Propanol (▽) und 1-Butanol (■) als jeweils einziges Substrat zugegeben. Als Negativkontrolle (○) diente ein Ansatz ohne Substrat.

Im Fall von *Dv. vulgaris* gab es keine Hinweise auf eine Regulation, da die drei alkoholischen Substrate sofort und ähnlich schnell wie Laktat verwertet werden (Abb.3.11 B). Im Gegensatz dazu verlief bei *Dt. psychrophila* die Verwertung der Alkohole wesentlich langsamer als die von Laktat (Abb. 3.11 A). Jedoch waren Sulfidbildungsraten über den gesamten Inkubationszeitraum praktisch gleich niedrig, so dass es auch hier keine deutlichen Hinweise auf ein regulatorisches Ereignis gab. Um diese physiologischen Daten zu untermauern, wurden die Zellsuspensionen nach Versuchsende geerntet und ihre jeweiligen Proteinextrakte mit Hilfe der 2DE untersucht. Die in den Genomen von beiden Organismen gefundenen *adh* Gene liegen, im Hinblick auf ihren isoelektrischen Punkt und ihr Molekulargewicht, im elektrophoretisch auftrennbaren Bereich und wären unter den angewandten Trennbedingungen erfassbar. In den Proteinmustern waren allerdings weder bei von *Dt. psychrophila*, noch bei von *Dv. vulgaris* Unterschiede erkennbar. Eine Regulation des Alkoholstoffwechsels, wie dies für *Db. autotrophicum* nachgewiesen wurde, scheint also bei diesen beiden Organismen nicht vorzuliegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für *Db. autotrophicum* eine Regulation der Verwertung von alkoholischen Substraten (Ethanol, 1-Propanol und 1-Butanol) *in vivo* sowie *in vitro* nachgewiesen werden konnte. In Wachstumsversuchen mit einem Substratgemisch zeigte sich, dass die Verwertung von 1-Propanol nicht durch Laktat unterdrückt wurde. 2DE und die Analyse der differenziell gebildeten Proteine führten zur Identifizierung einer Alkohol-Dehydrogenase, deren Expression auch auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen wurde. Diese hier festgestellten Regulationsprinzipien ließen sich

jedoch nicht verallgemeinern: *Dt. psychrophila* und *Dv. vulgaris* scheinen die Verwertung alkoholischer Substrate nicht zu regulieren.

3.3 Untersuchung der Methylmalonyl-CoA-Mutase (Propionatabbau) von *Db. autotrophicum* auf Transkriptionsebene

3.3.1 Identifizierung von Genen des Methylmalonyl-CoA Stoffwechselwegs

Das Gen (*mut*) der Methylmalonyl-CoA-Mutase konnte auf der vorhandenen Genomsequenzen von *Db. autotrophicum* identifiziert werden. In seiner unmittelbaren Nachbarschaft finden sich Gene für eine Fumarase (*fum*), mehrere Untereinheiten einer Fumarat-Reduktase (*frdABC*), zwei Untereinheiten einer Succinat-CoA-Ligase (*sucCD*), eine GTPase, eine Lactoglutathion-Lyase (*gloA*) sowie für ein Protein der CoA-Transferase Familie. Abbildung 3.12 zeigt den genomischen Kontext des *mut* Gens.

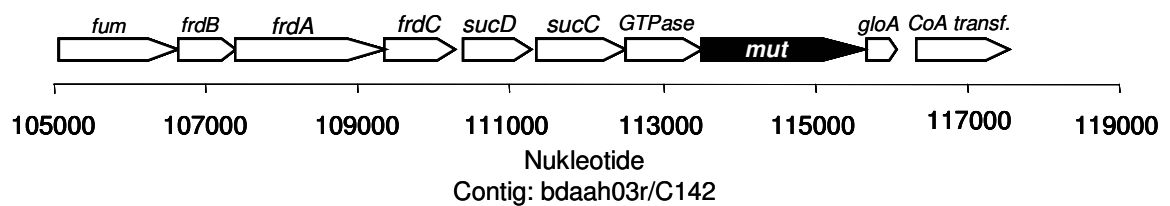


Abbildung 3.12 Genetische Umgebung des *mut* Gens (schwarz). In der unmittelbaren Umgebung befindet sich ein Gen für eine Fumarase (*fum*), mehrere Untereinheiten einer Fumarat-Reduktase (*frdABC*), zwei Untereinheiten einer Succinat-CoA-Ligase (*sucCD*), einer GTPase, einer Lactoglutathion-Lyase (*gloA*), sowie einer CoA-Transferase.

Die Gene bilden eine operonartige Struktur. Die von ihnen kodierten Enzyme lassen sich in die Reaktionssequenz von Methylmalonyl-CoA zu Oxalacetat einordnen. Die Methylmalonyl-CoA-Mutase (*mut*) führt, durch Rearrangement des C-Skeletts, Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA über. Letzteres kann durch die Succinat-CoA-Ligase (*sucCD*) in Succinat umgewandelt werden. Die Oxidation von Succinat zu Fumarat wird von der Fumarat-Reduktase (*frdBAC*) katalysiert. Schließlich hydratisiert die Fumarase (*fum*) Fumarat zu Malat. Gene für die noch fehlenden Reaktionsschritte, z.B. eine Carboxylase, die Methylmalonyl-CoA aus Propionyl-CoA bildet, wurden auf anderen Contigs des *Db. autotrophicum* Genoms gefunden (siehe 3.4).

Das Protein mit der größten Ähnlichkeit zur hier untersuchten Methylmalonyl-CoA-Mutase, war eine Methylmalonyl-CoA-Mutase aus *Leptospira interrogans*. In der Aminosäuresequenz des *mut* Genprodukts konnte die hoch konservierte Signatursequenz RIARNT (Charles und Aneja 1999) identifiziert werden (Position 370 bis 376). Auch das Bindemotiv für den Cobalamin Cofaktor (DxHxxG(41)SxL(26-28)GG, (Charles und Aneja 1999) wurde in der Aminosäuresequenz des *Db. autotrophicum* Proteins gefunden.

3.3.2 Physiologische Versuche

Um die Verwertung von Propionat genauer zu untersuchen, wurden erneut Wachstumsversuche durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit einem äquimolaren Gemisch aus Laktat und Propionat angezogen. Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte und Konzentrationen an Laktat, Acetat und Propionat verfolgt. Die in Abbildung 3.13 gezeigten Werte sind Durchschnittswerte aus zwei parallelen Wachstumsansätzen.

Laktat wird als Substrat eindeutig bevorzugt. Seine Konzentration nimmt stetig ab, während die Propionatkonzentration zunächst stabil bleibt. Die Verwertung von Propionat setzt erst ein, wenn Laktat vollständig aufgebraucht ist. Allerdings zeigt sich nicht der typische Verlauf einer diauxischen Wachstumskurve, da die Zellen nach Verbrauch des Laktats in die stationäre Phase eintreten. Ein weiteres Wachstum mit Propionat als Substrat findet hier nicht statt, wie sich dies auch schon in den Wachstumsversuchen mit verschiedenen Konzentrationen an 1-Propanol gezeigt hat (siehe Kapitel 3.2.1). Beim Verbrauch von Laktat scheiden die Zellen auch hier Acetat aus. Das Acetat wird jedoch nicht abgebaut. Propionat wird in der stationären Phase (zumindest bei Abwesenheit bevorzugter Substrate) gegenüber Acetat bevorzugt.

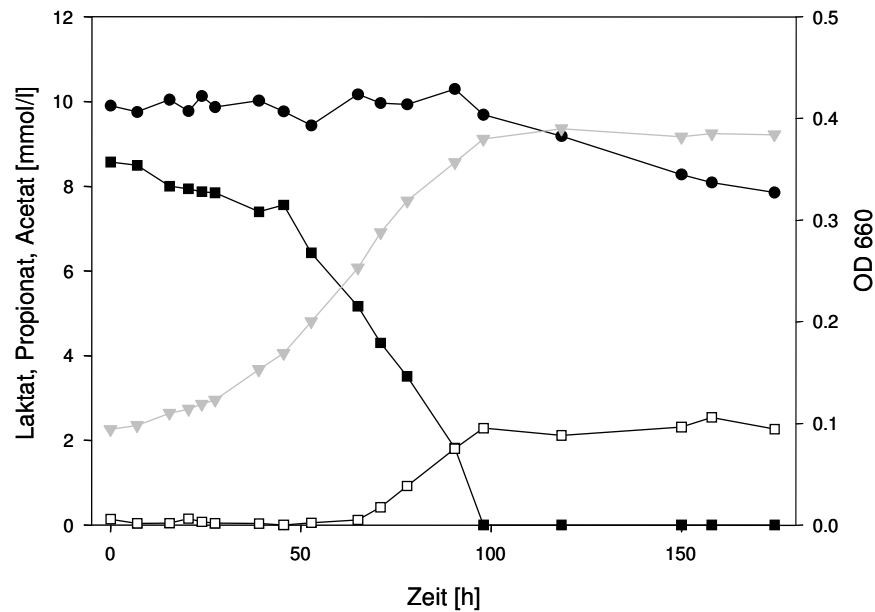


Abbildung 3.13 Wachstum von *Db. autotrophicum* mit einem Gemisch aus Propionat und Laktat. Gezeigt sind die OD 660 (▼), sowie die Konzentrationen an Laktat (■), Propionat (●) und Acetat (□).

3.3.3 Real-Time RT-PCR

Die Expression des *mut* Gens wurde in Zellen, die mit Laktat, 1-Propanol und einem Gemisch aus Laktat und 1-Propanol gewachsen waren, untersucht. Die gezeigten Induktionsraten beruhen auf Durchschnittswerten mehrerer Real-Time PCR Experimente und cDNA Synthesen. Grundlage bildete jedoch dieselbe RNA Präparation. Als Referenzgen diente wiederum die 16SrDNA und als Referenzzustand die Anzucht mit Laktat. Wiederholungsexperimente mit neuen RNA Präparationen aus parallelen Wachstumsansätzen führten zu einer Bestätigung der Ergebnisse.

In Zellen, die mit 1-Propanol gewachsen waren, war die *mut* Expression 10 Mal höher, als in Zellen, die mit Laktat gewachsen waren. Wurden die Zellen jedoch mit einem Gemisch aus Laktat und 1-Propanol kultiviert, zeigte sich keine erhöhte relative Expression (siehe Abb. 3.14).

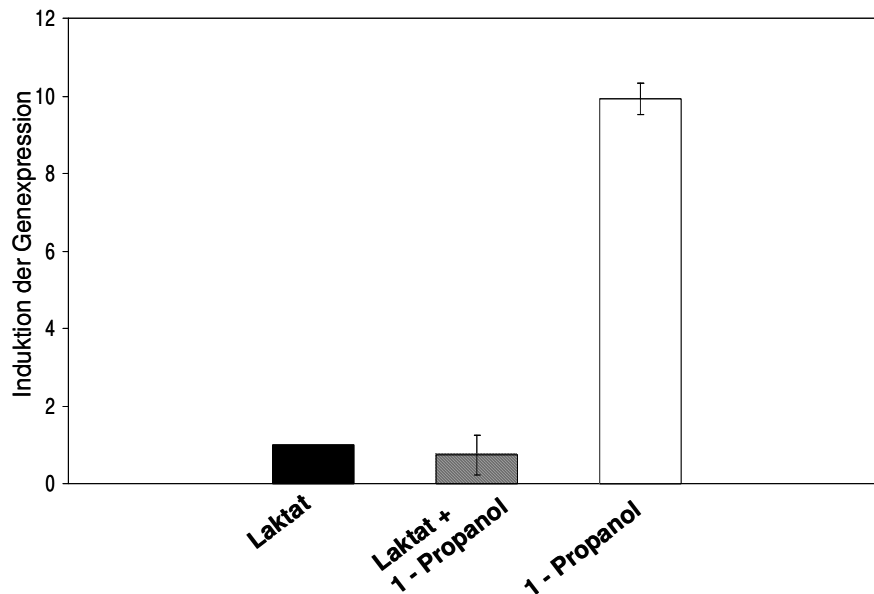


Abbildung 3.14: Relative Expression des *mut* Gens unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.

Die gemessene Induktion der *mut* Expression war deutlich geringer als zuvor für das *adh* Gen bestimmt. Eine grobe Abschätzung der gebildeten Transkriptmenge anhand des CT Wertes lässt jedoch den Schluss zu, dass der Grundlevel der *mut* Expression deutlich höher war, als bei dem *adh* Gen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Gene der Methylmalonyl-CoA-Mutase (*mut*) und der Alkohol-Dehydrogenase (*adh*) nicht koordiniert reguliert werden. Vielmehr scheint der Methylmalonyl-CoA Weg einer eigenen Regulation zu unterliegen.

3.4 CO-Dehydrogenase (terminale Oxidation)

Ein besonderes metabolisches Merkmal von *Db. autotrophicum* ist seine Fähigkeit den C1-Weg sowohl zur vollständigen Oxidation von Acetat zu CO₂ (heterotroph), als auch zur CO₂-Fixierung (autotroph) zu verwenden. Gene dieses zentralen Stoffwechselwegs konnten in der vorliegenden Genomsequenz von *Db. autotrophicum* vorhergesagt werden. Insbesondere konnten drei Gene bzw. Gencluster für das Schlüsselenzym dieses Stoffwechselwegs, die CO-Dehydrogenase, nachgewiesen werden. Zwei dieser drei *codh* Gene lassen sich mit einiger Wahrscheinlichkeit der Klasse der monofunktionalen, monomeren CODHs (Klasse IV) zuordnen. Bei der dritten CODH handelt es sich wahrscheinlich um eine multifunktionale CODH aus mehreren Untereinheiten. Dieser

Befund warf Fragen nach der grundsätzlichen Exprimierbarkeit dieser verschiedenen *codh* Gene und ihrer Regulation bei heterotrophem bzw. autotrophem Wachstum auf. Um diesen Fragen nachzugehen wurden Expressionsstudien mit Real-Time RT-PCR durchgeführt.

3.4.1 Genetische Umgebung der multimeren Acetyl-CoA-Synthase/CO-Dehydrogenase

Die eine Acetyl-CoA-Synthase/Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (ACS/CODH) ist ein Enzymkomplex aus vier verschiedenen Untereinheiten und daher höchstwahrscheinlich ein Enzym der Klasse IV. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, sind diese Enzyme in der Lage sowohl die reversible Oxidation von Kohlenmonoxid, als auch die Synthese oder Spaltung von Acetyl-CoA zu katalysieren (Lindahl 2002). Abbildung 3.15 zeigt die Anordnung der verschiedenen Untereinheiten der ACS/CODH. In ihrer unmittelbaren genetischen Umgebung befinden sich weitere Gene des C1-Wegs. Etwas weiter entfernt auf demselben Contig konnten noch zwei Gene, die für eine Formiat-Dehydrogenase (*fdh*) kodieren, gefunden werden.

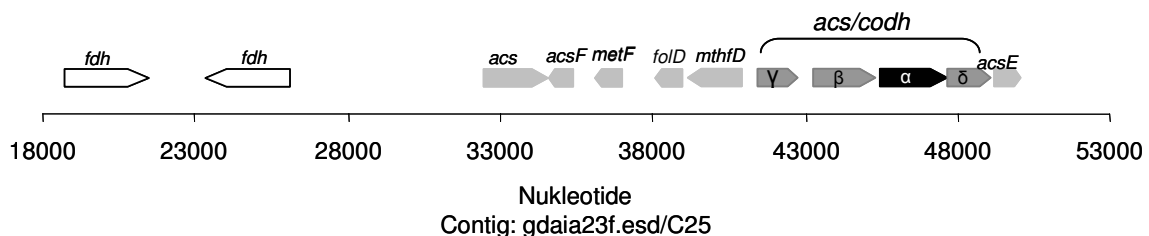


Abbildung 3.15 ACS/CODH Gene und die unmittelbare Umgebung. Die ACS/CODH besteht aus vier Untereinheiten (α , β , δ und γ). Die in hellem Grau gezeigten ORFs codieren für Gene des C1-Wegs: eine Acetyl-CoA-Synthetase (*acs*), ein CODH Maturation Faktor (*acsF*), ein Methylentetrahydrofolat-Reduktase (*metF*), eine Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase (*folD*), eine C1 Tetrahydrofolat- Synthase (*mthfD*) und eine Methyltransferase (*acsE*). In einem Abstand finden sich noch zwei gegenläufig orientierte Gene für eine Formate-Dehydrogenase (*fdh*, weiß). (siehe auch Abb. 1.6)

Die ACS/CODH besteht aus vier Untereinheiten, wobei die β -Untereinheit in diesem Fall die katalytische Untereinheit ist. Die α -Untereinheit (in Abbildung 3.15 schwarz) diente als Zielgen bei den Real-Time RT-PCR Experimenten. Die γ - und die δ -Untereinheit sind die große und die kleine Untereinheit eines Corrinoid-Eisen-Schwefel Proteins. Die restlichen Proteine sind Enzyme des C1-Wegs, den sie allerdings nicht

vollständig abdecken. Eine operonartige Anordnung besteht nicht, da nicht alle Gene gleich orientiert sind.

3.4.2 Zusätzliche monomere CO-Dehydrogenasen (CODH 1 und 2)

Zwei weitere Gene für katalytische Untereinheiten einer monomeren CODH konnten im Genom von *Db. autotrophicum* identifiziert werden. Die Untereinheit ist homolog zur katalytischen Untereinheit der multimeren ACS/CODH (Lindahl 2002). Diese Enzyme sind auf die reversible Oxidation von Kohlenmonoxid beschränkt. Beide Gene liegen in weitem Abstand (200 kb) auf demselben Contig. Sie werden im Folgenden mit *codh1* und *codh2* bezeichnet. Das Gen für CODH1 liegt in einem wenig aufschlussreichen genomischen Kontext (Abbildung 3.16).

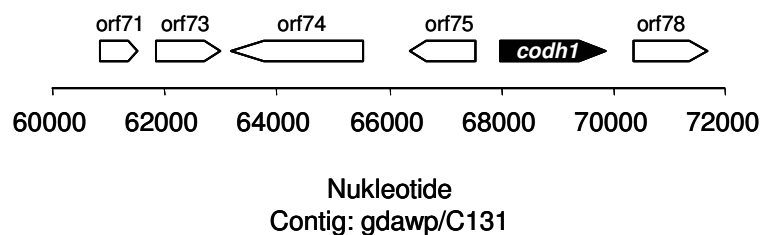


Abbildung 3.16 Genetische Umgebung des *codh1* Gens. In unmittelbarer Nachbarschaft befinden sich mögliche Gene für die kleine Untereinheit einer Isopropylmalat-Dehydrogenase (orf71), einen Transporter der Natrium/Sulfat Transporterfamilie (orf73), ein Aktivatorprotein für eine 2-Hydroxyglutaryl-Dehydrogenase (orf73), ein hypothetisches Protein (orf75) und eine NADH Oxidase (orf78).

In der näheren Umgebung für das Gen der CODH2 finden sich Gene für einige metabolische Enzyme (Laktat-Dehydrogenase, Citrat-Synthase, Isocitrat- Dehydrogenase), ein Gen, das wahrscheinlich für ein *c*-Typ Cytochrom kodiert, sowie Gene für zwei Untereinheiten einer Formiatdehydrogenase. Abbildung 3.17 stellt die genetische Umgebung dieser CODH bildlich dar.

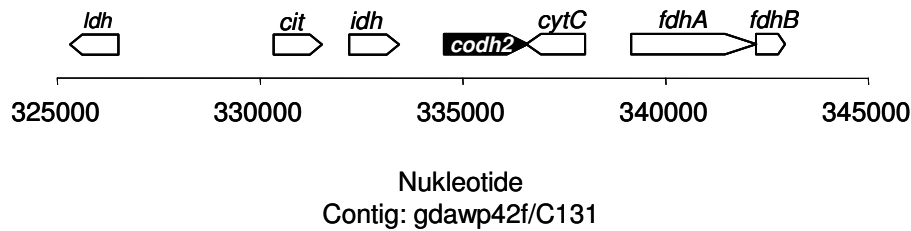


Abbildung 3.17 Genetische Umgebung des *codh2* Gens. In unmittelbarer Umgebung befinden sich Gene für eine Laktat-Dehydrogenase (*ldh*), eine Citrat-Synthase (*cit*), eine Isocitrat-Dehydrogenase (*idh*), ein *c*-Typ Cytochrom (*cytC*) und zwei Untereinheiten einer Formiat-Dehydrogenase (*fdhAB*).

3.4.3 Expression der verschiedenen CODH Gene

Die Expression der Gene für die α -Untereinheit der ACS/CODH sowie der CODH1 und CODH2 wurde mittels Real-Time RT-PCR untersucht. Die relative Expression der drei Gene wurde im Vergleich von autotrophem (H_2/CO_2) Wachstum mit heterotrophem Wachstum (Laktat) bestimmt. Referenzgen war die 16SrDNA. Die gezeigten Induktionsraten beruhen auf mehreren cDNA Synthesen und Real-Time PCR Experimenten mit einer RNA Präparation. Wiederholungsexperimente mit unabhängigen RNA Präparationen führten im Wesentlichen zu gleichen Ergebnissen.

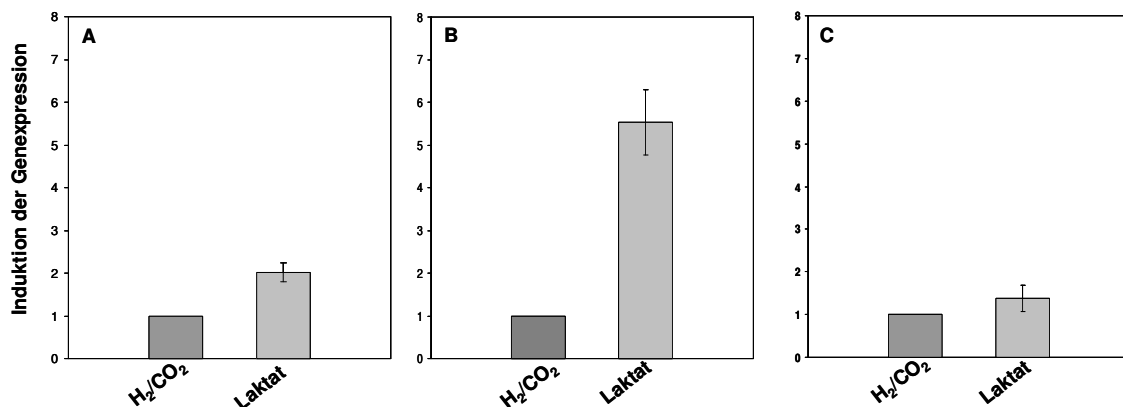


Abbildung 3.18 Expression der verschiedenen CODH Gene bei autotrophem (H_2/CO_2) und heterotrophem (Laktat) Wachstum. (A), CODH1; (B) CODH2; (C) α -Untereinheit der ACS/CODH.

Alle drei Gene sind sowohl unter autotrophen als auch unter heterotrophen Wachstumsbedingungen exprimiert und damit funktionale Genkopien. Während die relative Expression der ACS/CODH (Abbildung 3.18, C) bei autotrophem und heterotrophem Wachstum praktisch gleich ist, sind die Gene für CODH1 (Abbildung 3.18,

B) und CODH2 (Abbildung 3.18, C) bei heterotrophem Wachstum 2 bzw. 6 Mal stärker exprimiert als bei autotrophem Wachstum. Es handelt sich also bei den letzteren zwei Genen um differenziell regulierte.

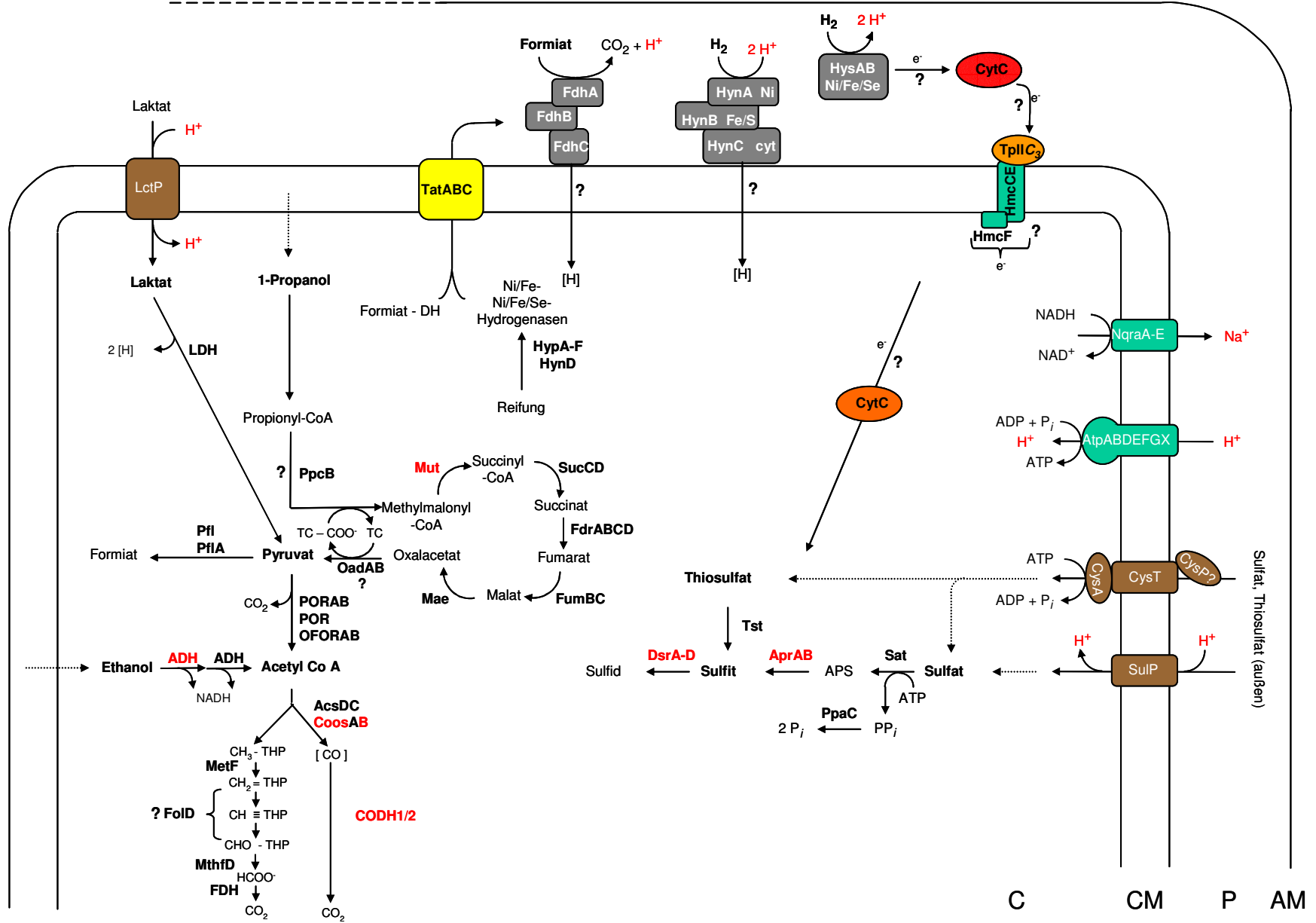
3.5 Metabolische Rekonstruktion zentraler Stoffwechselwege bei *Desulfobacterium autotrophicum*

Um die experimentell untersuchten Gene bzw. Proteine in ihren metabolischen Gesamtzusammenhang einzuordnen, sollten Stoffwechselwege von zentraler Bedeutung aus den vorhandenen Genomdaten rekonstruiert werden. Dabei wurde insbesondere nach Genen für den Abbau und Transport der untersuchten Substrate (Laktat, Ethanol, 1-Propanol, und Propionat), nach Genen für die Sulfatreduktion und den Energiestoffwechsel, sowie nach den Genen des C1-Wegs gesucht. Abbildung 3.19 zeigt eine Verknüpfung der rekonstruierten Stoffwechselwege unter Verwendung bekannter Gennamen. Schwarz markierte Gene konnten im vorläufigen Genom identifiziert werden, für rot markierte Gene konnte die Expression experimentell nachgewiesen werden. Entweder wurde das entsprechende Protein aus einem 2DE-Gel ausgestochen und identifiziert, oder die Expression des Gens konnte mittels Real-Time RT-PCR nachgewiesen werden. Die Genausstattung von *Db. autotrophicum* wurde mit der, anderer Sulfatreduzierer mit bekanntem Genom verglichen. Eine Tabelle in Kapitel 4.5 gibt hierzu einen umfassenden Überblick.

Laktat wird zunächst über eine Laktat-Permease (*lctP*) in die Zelle transportiert und dann über die Laktat-Dehydrogenase (*ldh*) zu Pyruvat oxidiert. Eine mögliche Laktat-Dehydrogenase (*ldh*) konnte identifiziert werden. Für die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA ist eine Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase zuständig. Neben α - und β -Untereinheiten einer multimeren Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (*pforAB*), konnte auf dem Genom auch ein ORF, der für eine monomere Pyruvat: Ferredoxin Oxidoreduktase kodiert, identifiziert werden. Acetyl-CoA wird dann über den C1-Weg vollständig zu CO₂ oxidiert. Gene die für den entsprechenden Stoffwechselweg kodieren konnten, wie bereits in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben wurde, identifiziert werden. *Db. autotrophicum* ist wahrscheinlich auch in der Lage Pyruvat über eine Pyruvat-Formiat-Lyase zu Formiat umzusetzen (*pfl*, *pflA*). Formiat kann durch eine Formiat-Dehydrogenase (*fdh*), von denen mehrere Kopien im Genom gefunden wurden, zu CO₂ und H⁺ umgesetzt werden.

Die alkoholischen Substrate werden initial von der identifizierten Alkohol-Dehydrogenase oxidiert. Im Fall des Ethanol wird der entstandene Acetaldehyd über eine Aldehyd-Dehydrogenase direkt zu Acetyl-CoA umgesetzt, während bei 1-Butanol eine β -Oxidation zu zwei Molekülen Acetyl-CoA führt. Auch für den Methylmalonyl-CoA Weg, über den der Abbau von 1-Propanol und Propionat verläuft, konnten die meisten Gene identifiziert werden. Es bleibt allerdings unklar, ob Propionyl-CoA über eine Propionyl-CoA-Carboxylase (*ppc*) zu Methylmalonyl-CoA umgewandelt wird, oder ob hierfür eine Methylmalonyl-CoA-Carboxyltransferase zuständig ist, die gleichzeitig in der Lage ist den Carboxylrest von Oxalacetat (unter Bildung von Pyruvat) aufzunehmen. Es konnte nur eine Untereinheit einer Propionyl-CoA-Carboxylase identifiziert werden. Gleichzeitig wurde eine mögliche Methylmalonyl-CoA-Carboxyltransferase identifiziert. Der beste BLAST Hit zum entsprechenden Genprodukt ist eine Acetyl-CoA-Carboxyltransferase, jedoch besteht auch eine signifikante Ähnlichkeit zur Methylmalonyl-CoA-Carboxyltransferase aus *Propionibacterium freudenreichii*.

Abbildung 3.19 (folgende Seite) Rekonstruktion zentraler Stoffwechselwege von *Db. autotrophicum* auf Basis der vorhandenen Genomsequenz. Exprimierte Gene sind rot markiert. Reaktionsschritte über deren Verlauf Unklarheit herrscht sind mit einem Fragezeichen versehen. C: Cytoplasma; CM: Cytoplasmamembran; P: Periplasma; AM: Außenmembran;



Auf 2DE-Gelen konnten auch zwei Enzyme der Sulfatreduktion identifiziert werden: AprA (α -Untereinheit der APS-Reduktase) und DsrB (β -Untereinheit der dissimilatorischen Sulfitreduktase). Die APS-Reduktase katalysiert die Reduktion von Adenosinphosphosulfat zu Sulfit und wird von den *aprAB* Genen kodiert. Die α -Untereinheit der APS-Reduktase war unter autotrophen Bedingungen am abundantesten (siehe Kapitel 3.2.2.2, Spot 16). Direkt upstream von *aprAB* liegen ORFs, die für Untereinheiten von Heterodisulfidreduktasen (*hdr, hdrA*) kodieren. Abbildung 3.20 zeigt den genomischen Kontext der APS-Reduktase Gene (*aprAB*).

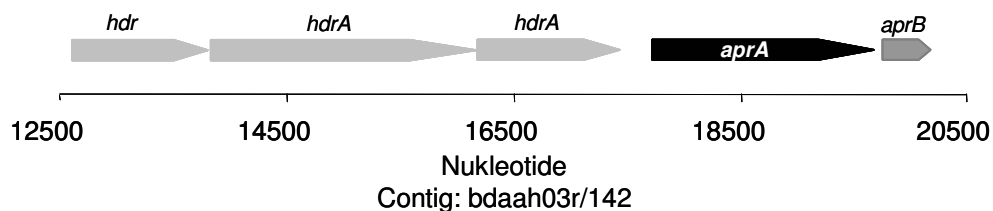


Abbildung 3.20 Genetischer Kontext der APS Reduktase Gene(*aprAB*). Die upstream liegenden *hdr* und *hdrA* Gene kodieren für Untereinheiten einer Heterodisulfidreduktase.

Die weitere Reduktion von Sulfit zu Sulfid erfolgt durch die dissimilatorische Sulfitreduktase (DSR). Sie wird von den Genen des *dsr* Operons kodiert. Neben den in Abbildung 3.21 gezeigten Genen des *dsr* Operons (*dsrABDN*) konnte noch das Gen für die γ -Untereinheit der DSR (*dsrC*) auf einem anderen Contig identifiziert werden. Die isolierte Lage von *dsrC*, im Gegensatz zur Operonstruktur der *dsrABDN* Gene, ist auch von anderen Sulfatreduzierern bekannt (Karkhoff-Schweizer et al. 1993). Direkt vor den *dsr* Genen liegen zwei konservierte hypothetische Gene (*hyp*), die dem *dsr* Operon zugerechnet werden (Pott und Dahl 1998; Larsen et al. 2000).

Auch die restliche Gene der dissimilatorischen Sulfatreduktion wurden gefunden. Es handelt sich um die Sulfatadenylyl-Transferase (*sat*) und eine Pyrophosphat-Hydrolase (*ppaC*) für die Aktivierung von Sulfat zu APS. Eine Thiosulfat-Reduktase (*tst*) war nicht überraschend, da der Organismus Thiosulfat als einen alternativen Elektronenakzeptor nutzen kann. Auch ein protonengetriebener Sulfattransporter (*sulP*) und ein ABC – Transporter (*cysATP*) für Sulfat und Thiosulfat wurden gefunden.

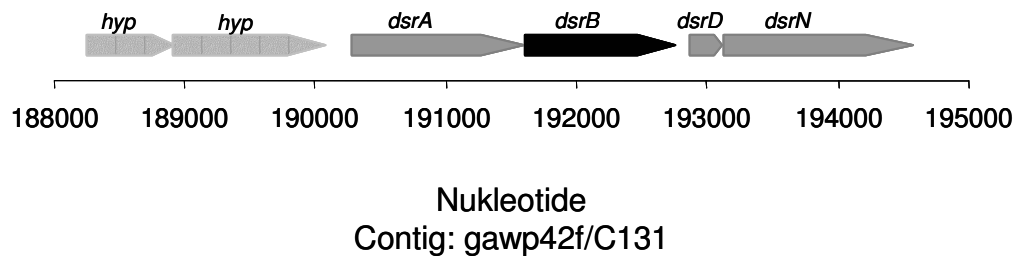


Abbildung 3.21 Dsr Operon (*dsrABDN*) mit zwei benachbarten konserviert hypothetischen Proteinen (*hyp*).

Db. autotrophicum verfügt auch über eine Vielzahl verschiedener Hydrogenasen, [NiFeSe]-Hydrogenasen, [NiFe]-Hydrogenasen und Methylviologen-abhängige Hydrogenasen. Auch Gene für verschiedene *c*-Typ Cytochrome konnten im Genom entdeckt werden. Es handelt sich hierbei um ein Gen für Tetrahäm Cytochrom *c*₃, sowie für TypII *c*₃ Cytochrome. In unmittelbarer Nachbarschaft zu diesen Genen befinden sich Gene, die für zwei Untereinheiten des Hmc-Komplexes kodieren (*hmcE*, *hmcF*). Analog zur Situation bei *Dv. vulgaris* und anderen Sulfatreduzierern kann man davon ausgehen, dass diese beiden Proteine zusammen mit dem Cytochrom einen Transmembrankomplex bilden (Valente et al. 2001). *C*-Typ Cytochrome konnten ebenfalls experimentell über spektrometrische Vermessung nachgewiesen werden. (siehe Abschnitt 3.6). *C*-Typ Cytochrome sind am Elektronentransport von den periplasmatischen Hydrogenasen zur cytoplasmatischen Sulfatreduktion beteiligt.

3.6 Cytochromanalyse bei *Desulfotalea psychrophila*, *Desulfobacterium autotrophicum* und *Desulfovibrio vulgaris*

Im Rahmen der Annotation des *Dt. psychrophila* Genoms (Rabus et al. 2004) wurde der überraschende Befund gemacht, dass *Dt. psychrophila* im Gegensatz zu anderen sulfatreduzierenden Bakterien, keine Gene für *c*-Typ Cytochrome besitzt. Um diesen Befund mit physiologischen Daten zu untermauern wurden Differenzspektren (reduziert – oxidiert) zellfreier Extrakte von *Dt. psychrophila*, *Db. autotrophicum* und *Dv. vulgaris* aufgenommen. *Dv. vulgaris* diente hierbei als Positivkontrolle, da in diesem Organismus *c*-Typ Cytochrome bestens untersucht sind (Odom und Peck 1984). Im Genom von *Dt. psychrophila* wurde nach Proteinen gesucht, die die Funktion klassischer *c*-Typ Cytochrome übernehmen könnten.

Es wurden für alle drei Organismen zellfreie Extrakte hergestellt. Nach Oxidation wurde von jedem Extrakt ein Absorptionsspektrum (400 – 800 nm) aufgenommen. Danach wurden die Proben chemisch reduziert und es wurden erneut Spektren aufgenommen. Abbildung 3.22 zeigt die Differenzspektren der drei verschiedenen Organismen. Erwartungsgemäß sind bei *Db. autotrophicum* und *Dv. vulgaris* die für *c*-Typ Cytochrome typischen Absorptionsmaxima (551, 520 und 420 nm) nachweisbar. Diese stimmen mit den Literaturwerten für die α -, β - und γ -Absorptionsbanden gut überein (Poole 1994). Im Gegensatz dazu waren diese Absorptionsmaxima in Extrakten von *Dt. psychrophila* nicht nachweisbar. Dieser Befund deckte sich mit der bioinformatischen Vorhersage.

Da sich für *Dt. psychrophila* keine *c*-Typ Cytochrome nachweisen ließen, stellte sich die Frage, welche Proteine deren Rolle beim Elektronentransport übernehmen könnten. Es kommen hier beispielsweise Ferredoxine oder Flavodoxine in Frage. Tatsächlich konnten mehrere Gene für mögliche Ferredoxine und Flavodoxine im Genom von *Dt. psychrophila* identifiziert werden. Typische Signalpeptide, die eine periplasmatische Lokalisation anzeigen, konnten hier nicht gefunden werden. Allerdings verfügt eines der Flavodoxine über ein Twin-Arginin-Motiv (Berks 1996), was auf eine periplasmatische Lokalisation hinweist.

Im Genom von *Db. autotrophicum* konnten mehrere Gene, die für *c*-Typ Cytochrome, bzw. deren Vorläufermoleküle kodieren, gefunden werden. Dieser Befund bestätigt die experimentellen Daten.

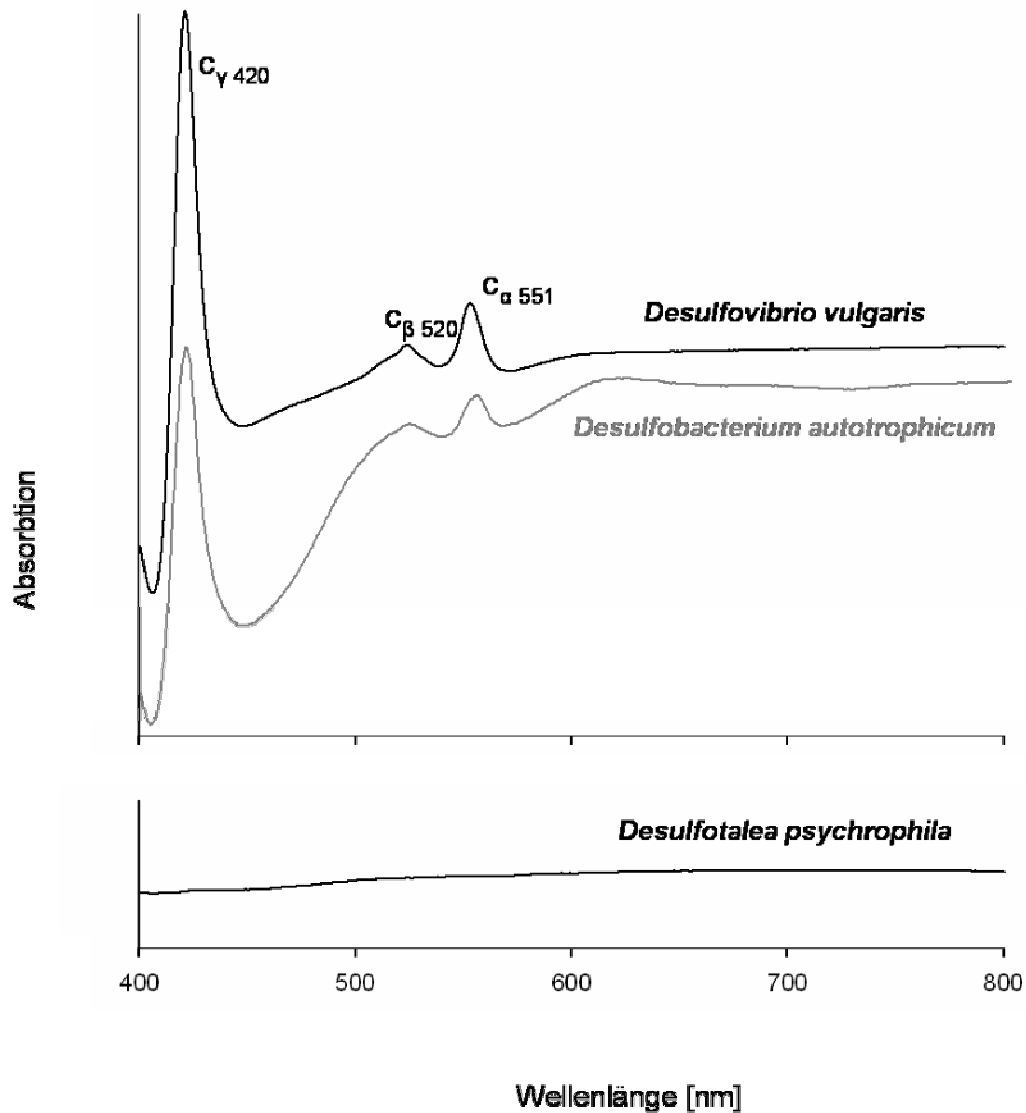


Abbildung 3.22 Differenzspektren (reduziert – oxidiert) zellfreier Extrakte von *Dv. vulgaris*, *Db. autotrophicum* und *Dt. psychrophila*. Für *Dv. vulgaris* und *Db. autotrophicum* sind typische Absorptionsmaxima von *c*-Cytochromen zu erkennen, bei *Dt. psychrophila* fehlen sie. Die Zahlenwerte bei C_{α} – γ geben die experimentell bestimmten Wellenlängen der Absorptionsmaxima wieder.

4 DISKUSSION

4.1 Analyse der Temperaturanpassung von *Desulfohalobacterium autotrophicum* mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese

Desulfohalobacterium autotrophicum wurde ursprünglich als mesophil mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 28°C beschrieben (Brysch et al. 1987). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Bakterium auch noch bei Temperaturen bis 0°C wachsen kann (Rabus et al. 2002). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Temperaturanpassung von *Db. autotrophicum in vitro* mittels 2DE untersucht. Die Zellen waren über mehrere Passagen an das Wachstum bei 4, 10 oder 28°C angepasst. Sie wurden also keinem Kälteschock ausgesetzt, der als plötzlicher Transfer der Bakterien zu einer kälteren Temperatur definiert wird. Beim Kälteschock kommt es zu einer für Bakterien typischen, vorübergehenden Antwort, die in der Neubildung sogenannter „cold shock proteins“ (CSPs) und der Herunterregulierung von Haushaltsgenen besteht (Panoff et al. 1998). Auch ist bekannt, dass Bakterien bei einer Anpassung an kalte Temperaturen, bei denen sie noch in der Lage sind zu wachsen, so genannte „cold acclimation proteins“ (CAPs) synthetisieren (Graumann und Marahiel 1996). Die Bildung dieser Proteine ist für verschiedene Mikroorganismen nachgewiesen (Panoff et al. 1997; Colucci und Inniss 1996; Berger et al. 1996). Den CAPs wird eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Metabolismus bei kälteren Temperaturen zugeschrieben (Berger et al. 1996). Die Proteinmuster, der bei verschiedenen Temperaturen kultivierten Zellen von *Db. autotrophicum*, wiesen jedoch kaum Unterschiede auf. Eine vermehrte Häufigkeit bestimmter Proteine als Antwort auf kalte Temperaturen konnte überhaupt nicht beobachtet werden. Im Genom wurden zu einem späteren Zeitpunkt jedoch 7 ORFs identifiziert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit für Kälteschockproteine kodieren. Diese könnten auch bei der Kälteanpassung von *Db. autotrophicum* eine Rolle spielen, da es Überschneidungen zwischen beiden Gruppen gibt (Panoff et al. 1997; Colucci und Inniss 1996).

Auch im Genom von *Dt. psychrophila* gibt es verschiedene ORFs, die für Kälteschockproteine kodieren. Tabelle 4.1 zeigt die Sequenzähnlichkeiten der vorhergesagten Kälteschockproteine beider SRB. Die Werte zeigen, dass die Genprodukte der größeren ORFs bei *Db. autotrophicum* eine insgesamt geringere Ähnlichkeit zu den

ORFs aus *Dt. psychrophila* aufweisen, während die der kleineren ORFs hoch konserviert sind und Ähnlichkeiten von bis zu 90% haben.

Tabelle 4.1 Ähnlichkeit der Kälteschockproteine von *Db. autotrophicum* und bei *Dt. psychrophila*^a:

<i>Dt.</i>	<i>Db. autotrophicum</i>						
	C42_0421	C42_0014	C142_0190	C142_017	C92_0038	C93_0001	C119_0189
<i>psychrophila</i>	(217)	(92)	(86)	3 (66)	(217)	(66)	(66)
DP0237 (195)	50% ^b				47% ^b		
DP0362 (66)		84%	90%	80%		89%	87%
DP0935 (66)		84%	89%	81%		87%	86%
DP0960 (66)		82%	86%	75%		84%	83%
DP1086 (176)		50% ^b	53% ^b	51% ^b		53% ^b	56% ^b
DP1872 (66)		84%	86%	81%		81%	86%
DP2067 (204)	61%				61%		
DP2200 (66)		83%	80%	76%		76%	83%

^aDie Lage der vorhergesagten Kälteschockproteine in Aminosäuren ist jeweils in Klammern angegeben. Die Ähnlichkeitswerte sind in [%] angegeben.

^bAlignment nur teilweise möglich

Homologe von Kälteschockproteinen spielen nicht unbedingt eine Rolle bei der Anpassung an kalte Temperaturen oder sind durch niedrige Temperaturen induzierbar (Phadtare et al. 1999). Daher könnten den bei *Db. autotrophicum* identifizierten, offenbar nicht durch Kälte regulierten, großen ORFs eine andere Rolle zukommen als bei *Dt. psychrophila*.

Durch proteomische Analyse konnten zwei Proteine identifiziert werden, deren Häufigkeit eine Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur zeigte. Sie waren in Zellen, die bei 28°C kultiviert wurden, um den Faktor 11,07 bzw. 4,82 häufiger als in Zellen, die bei 4°C gewachsen waren. Eines dieser Proteine konnte als ein mögliches Peroxiredoxin identifiziert werden.

Peroxiredoxine sind in allen drei Reichen ubiquitär verbreitet. Bei *E. coli* gehören sie zu den zehn häufigsten Zellproteinen (Link et al. 1997). Sie werden der Thioredoxin Proteinfamilie zugerechnet. In der Regel besitzt ein Organismus mehrere Isoformen von

Peroxiredoxinen (Wood et al. 2003). Peroxiredoxine haben bei Bakterien eine Funktion bei der Abwehr von oxidativem Stress. Sie sind in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies, wie organische Hyperoxide und H_2O_2 , zu entgiften, indem sie die Verbindung zu dem entsprechenden Alkohol bzw. zu Wasser reduzieren (Wood et al. 2003). Bei *E. coli* wird einem Protein aus dieser Familie sogar die Hauptrolle beim Abfangen von H_2O_2 in der Zelle zugeschrieben (Costa Seaver und Imlay 2001). Die Peroxiredoxine lassen sich in drei verschiedene Klassen einteilen, je nachdem über wie viele katalytisch aktive Cysteine sie verfügen. Zwei Sequenzmotive sind für Peroxiredoxine mit einem katalytisch aktiven Cystein typisch: Region I (PxDFTPVCTTE) und Region II (HxxWxxI) (Wood et al. 2003). Beide Motive sind in der Aminosäuresequenz des identifizierten Peroxiredoxins vorhanden. Es lässt sich somit dieser Klasse von Peroxiredoxinen zuordnen.

Neuere Untersuchungen an Hefe haben ergeben, dass Peroxiredoxine zusätzlich zu ihrer Peroxidaseaktivität auch eine Chaperonfunktion übernehmen können. Welche der beiden Funktionen überwiegt, hängt davon ab, ob die Peroxiredoxine in multimeren Komplexen vorliegen (Jang et al. 2004). Die Chaperonfunktion ist an das Vorliegen von Proteinkomplexen gebunden. Die Bildung dieser Komplexe kann durch oxidativen Stress, aber auch durch Hitzestress ausgelöst werden (Jang et al. 2004). Eine vermehrte Bildung von Peroxiredoxinen unter verschiedenen Stressbedingungen wird für verschiedene Bakterien beschrieben (Antelmann et al. 1996; Leblanc et al. 2003).

Die Zellen von *Db. autotrophicum* waren zwar keinem Hitzeschock oder anderem Stress ausgesetzt, es lässt sich aber spekulieren, dass bei höheren Temperaturen eine mögliche Chaperonfunktion des Peroxiredoxins eher benötigt wird als bei tiefen Temperaturen. Dies würde eine Erklärung für die Hochregulation bei einer höheren Wachstumstemperatur bieten, zumal bei *Db. autotrophicum* optimale (28°C) und maximale (31°C) Wachstumstemperatur nahe beieinander liegen.

Die Adaption von *Db. autotrophicum* an Kälte geht also nicht mit einer nachweisbaren Änderung der Proteinausstattung der Zelle einher. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Enzyme von *Db. autotrophicum* über einen breiten Temperaturbereich funktional sind. Eine energieaufwändige Neusynthese eines speziellen Proteinsets ist also nicht nötig. Bei Kälte-angepassten Mikroorganismen werden CSPs vermutlich kontinuierlich bei tiefen Temperaturen gebildet, um den Organismus vor den Auswirkungen von Kälte zu schützen (Phadtare et al. 1999). In diesem Fall könnten die gefundenen Kälteschockproteine auch bei optimaler Wachstumstemperatur in gleicher Abundanz vorliegen bzw. dass das Ausmaß ihrer Regulation zu gering sein, um mit dem

angewandten Testsystem nachgewiesen zu werden. Von Untersuchungen an psychrophilen Mikroorganismen ist bekannt, dass der relative Induktionslevel der CSPs oder CAPs hinter den Induktionsraten von mesophilen Organismen zurückbleibt (Phadtare et al. 1999). Außerdem haben die meisten CSPs ein zu geringes Molekulargewicht, um mit den angewandten Methoden detektiert zu werden. Die Antwort von *Db. autotrophicum* auf kalte Temperaturen besteht lediglich in der Erniedrigung metabolischer Aktivitäten und Zellteilungsraten, sowie in einer Änderung der Fettsäurezusammensetzung seiner Membranen. Bei tieferen Temperaturen konnte ein erhöhter Anteil an ungesättigten Fettsäuren nachgewiesen werden (Rabus et al. 2002).

4.2 Regulation der Alkohol-Dehydrogenase in *Desulfobacterium autotrophicum*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation einer Alkohol-Dehydrogenase, die mit hoher Wahrscheinlichkeit den Abbau der drei Alkohole Ethanol, 1-Propanol und 1-Butanol katalysiert, mit verschiedenen experimentellen Ansätzen untersucht. Die erhaltenen Daten aus physiologischen Experimenten, 2DE und Real-Time RT-PCR ergeben ein einheitliches Bild.

4.2.1 Physiologische Experimente

Versuche mit Zellsuspensionen zeigten, dass *Db. autotrophicum* nicht in der Lage ist Alkohole (Ethanol, 1-Propanol, 1-Butanol) sofort zu verwerten, wenn die Zellen zuvor mit Laktat kultiviert worden waren. Eine Verwertung trat frühestens nach einer Inkubationszeit von ca. 2 h ein. Dies deutete eindeutig auf eine Regulation des Alkoholabbaus hin. Wachstumsversuche haben gezeigt, dass Laktat und 1-Propanol gleichzeitig abgebaut werden können, wobei Acetat und Propionat als Zwischenprodukte ausgeschieden wurden. Dies ist auch für vollständige Oxidierer nicht ungewöhnlich, wenn die organischen Substrate im Überschuss vorliegen (Widdel 1988). Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass *Db. autotrophicum* die ausgeschiedenen Zwischenprodukte wieder aufnehmen und weiter verwerten kann. Die gleichzeitige Verwertung verschiedener Substrate ist für einen Mikroorganismus, der in einem Habitat mit geringen Substratkonzentrationen lebt, eine sinnvolle Überlebensstrategie.

Die Weiterverwertung von Propionat wird im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Expression der Methylmalonyl-CoA-Mutase (*mut*) genauer diskutiert (siehe Kapitel 4.3).

4.2.2 Expressionsstudien auf Protein- und RNA Ebene

Bei mit Alkoholen gewachsenen Zellen konnten bis zu drei differenziell gebildete Proteine nachgewiesen werden, die beim Wachstum mit Laktat kaum nachweisbar waren. Durch Edmann-Abbau und MALDI-TOF MS konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei zwei dieser Proteine um jeweils die gleiche Alkohol-Dehydrogenase handelt. Ihr kodierendes Gen konnte in der vorläufigen Genomsequenz von *Db. autotrophicum* identifiziert werden. Die Expression dieser ADH unter verschiedenen Wachstumsbedingungen wurde auf Transkriptionsebene mittels Real-Time RT-PCR untersucht. Die Ergebnisse bestätigen die relative Quantifizierung auf Proteinebene und zeigen einen vergleichbaren Trend, auch wenn die absoluten Zahlen unterschiedlich sind. Ergebnisse aus proteomischen Experimenten und Real-Time RT-PCR Experimenten sind nicht unbedingt absolut vergleichbar, sondern liefern eher sich ergänzende Informationen (Yang et al. 2002). In der Literatur konnten aber, außer dieser zitierten Arbeit, kaum vergleichende Studien gefunden werden.

Bei der identifizierten ADH handelt es sich um eine eisenabhängige ADH mit hoher Ähnlichkeit zur ADHII von *Zymomonas mobilis* (Scopes 1983; Conway et al. 1987). Die ADHII von *Z. mobilis* ist hier für die Oxidation von Ethanol zuständig (Kalnieks et al. 2002). Auf 2DE Gelen von *Db. autotrophicum*, die ohne Sulfat gewachsen waren, konnte die ADH nicht identifiziert werden. Die Tatsache, dass die ADH von *Db. autotrophicum* beim fermentativen Wachstum nicht gebildet wird, spricht auch hier für eine Rolle bei der Oxidation. Sie gehört zu den eisenabhängigen ADHs bzw. Gruppe IV ADHs und benötigt Eisen als Cofaktor. Ein weiteres Merkmal einer Reihe von Gruppe IV ADHs ist ihre hohe Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff (Cabiscol et al. 1994). Die ADHII von *Z. mobilis* ist spezifisch für Ethanol, andere Vertreter dieser Gruppe von ADHs verfügen jedoch über ein breiteres Substratspektrum (Reid und Fewson 1994). Auch bei Sulfatreduzierern wurden eisenabhängige ADHs charakterisiert. So ist beispielsweise eine Alkohol-Dehydrogenase vom *Desulfovibrio* Stamm HDv bekannt, die ein decameres Enzym ist. Die bevorzugten Substrate dieser ADH sind Ethanol und 1-Propanol (Hensgens et al. 1995). Aus *Desulfovibrio gigas* konnte eine weitere Gruppe IV Alkohol-

Dehydrogenase isoliert werden. Sie ist ebenfalls ein Decamer mit den höchsten Aktivitäten für Ethanol und Propanol (Hensgens et al. 1993). Beide haben also ein ähnliches Substratspektrum wie die bei *Db. autotrophicum* identifizierte ADH und sie scheinen ebenfalls reguliert zu sein, da ADH-Aktivitäten in mit Laktat kultivierten Zellen signifikant niedriger waren (Kremer et al. 1988).

Im Fall der ADH von *Z. mobilis* konnten Aminosäuren identifiziert werden, die die Substratspezifität des Enzyms beeinflussen. Die ADH von *Z. mobilis* besitzt normalerweise Aktivität gegenüber Ethanol, 1-Propanol und Allylalkohol, wobei die Aktivität gegenüber Ethanol am höchsten ist. Es konnte jedoch eine deutliche Steigerung der Aktivität gegenüber 1-Butanol insbesondere dann festgestellt werden, wenn die Aminosäure an Position 161 von Alanin zu Valin oder Isoleucin ausgetauscht wurde. Auch alle anderen wirksamen Veränderungen betrafen den Bereich von Aminosäure 155 bis 167. Neben der bereits erwähnten gesteigerten Aktivität gegenüber 1-Butanol konnte auch eine stark gesteigerte Aktivität des Enzyms bei hohen Alkoholkonzentrationen festgestellt werden (Rellos et al. 1997). Tabelle 4.2 zeigt den betreffenden Sequenzbereich der ADH beim Wildtyp und verschiedenen Mutanten von *Z. mobilis*, sowie bei *Db. autotrophicum*. Das Valin₁₆₁ der *Z. mobilis* (Wildtyp) ADH ist auch in der ADH von *Db. autotrophicum* konserviert. Es gibt jedoch auch Abweichungen. Statt den Aminosäuren Valin₁₅₅ und Arginin₁₆₅ besitzt die ADH von *Db. autotrophicum* an dieser Stelle ein Serin bzw. Tryptophan. Da Mutationen an diesen Positionen in *Z. mobilis* zu einer verstärkten Aktivität gegenüber 1-Butanol in Verbindung gebracht werden, könnten diese Reste auch für das Substratspektrums der ADH von *Db. autotrophicum* von Bedeutung sein.

Tabelle 4.2. Aminosäuresequenz von Alkohol-Dehydrogenasen^a

Organismus	Aminosäuresequenz												
<i>Z. mobilis</i> (Wildtyp)	V	R	H	V	K	M	A	I	V	D	R	H	V
<i>Z. mobilis</i> (Mutanten)	I/V	R	H	V	K	M	V/I	I	V	D	H	H	V
<i>Db. autotrophicum</i>	S	R	K	V	K	M	A	I	V	D	W	R	C

^a Es ist der Bereich von Aminosäure 155 – 167 bezogen auf die ADH von *Z. mobilis* (Wildtyp) dargestellt. Grau hinterlegte Bereiche weisen auf ausgetauschte Aminosäuren bei *Db. autotrophicum* hin. Fettgedruckte Reste sind wahrscheinlich für die Substratspezifität von Bedeutung.

Ein typisches Merkmal der Gruppe IV Alkohol-Dehydrogenasen ist das Eisen-Bindemotiv (Daniel et al. 1995). Es konnte in der abgeleiteten Aminosäuresequenz des identifizierten *adh* Gens nachgewiesen werden. Es kann also davon ausgegangen werden,

dass auch die *Db. autotrophicum* ADH Eisen benötigt. Bindemotive für Cofaktoren wie NADH oder NADPH konnten nicht identifiziert werden, so dass deren Vorkommen in der ADH von *Db. autotrophicum* eher unwahrscheinlich ist. Auch für verschiedene andere ADHs der Gruppe IV konnten solche Bindemotive nicht nachgewiesen werden (Reid und Fewson 1994).

In unmittelbarer Nachbarschaft des *adh* Gens, wenngleich in entgegengesetzter Leserichtung, wird ein Zwei-Komponenten-Regulationssystem kodiert. Abbildung 4.1 beschreibt die Funktionsweise solcher Systeme. Sie bestehen in der Regel aus einer Sensor- und einer Regulator-Komponente. Der Sensor verfügt über einen konservierten C-Terminus (Histidinkinase Domäne) und nimmt das Umweltsignal direkt oder indirekt wahr, worauf eine ATP-abhängige Autophosphorylierung erfolgt. Dann wird der Phosphatrest auf den Regulator übertragen, wodurch eine Konformationsänderung seiner C-terminalen Domäne induziert wird. Danach ist diese Domäne in der Lage an die DNA zu binden und die Transkription zu aktivieren (Albright et al. 1989). Der identifizierte Regulator verfügt über eine δ^{54} Interaktionsdomäne, d.h. dass der alternative δ^{54} Faktor für die Transkription des von ihm regulierten Gens zuständig ist. Außerdem konnte ein Helix-Turn-Helix DNA Bindemotiv identifiziert werden.

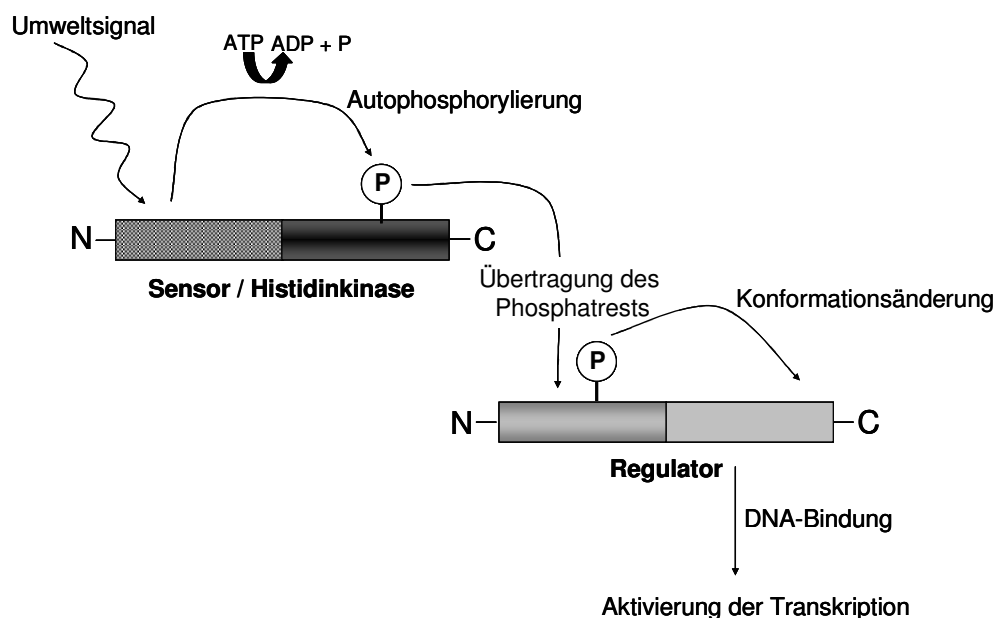


Abbildung 4.1 Funktionsweise von Zwei-Komponenten-Regulationssystemen.

Die räumliche Nähe der Gene für das Zwei-Komponenten-Regulationssystem und die ADH legt die Vermutung nahe, dass ersteres in der Regulation des *adh* Gens involviert ist. Der Nachweis einer transkriptionalen Regulation des *adh* Gens durch das Real-Time RT-PCR Experiment stimmt mit einer solchen Annahme überein. Häufig ist es so, dass Zwei-Komponenten-Regulationssysteme in unmittelbarer Nachbarschaft zu den von ihnen regulierten Genen liegen (Studholme und Dixon 2003). Die Regulation der Expression von *adh* Genen durch ein Zwei-Komponenten-Regulationssystem konnte schon mehrfach nachgewiesen werden. So ist z.B. die Methanol-Dehydrogenase (MDH) von *Paracoccus denitrificans* strikt reguliert (De Vries et al. 1988). Die Expression der beiden MDH-kodierenden *moxF* und *moxI* Gene wird durch das Zwei-Komponenten-Regulationssystem MoxZY (Harms et al. 1993) und FlhRS konzertiert reguliert (Harms et al. 2001). Dabei ist insbesondere die Expression von *moxF* δ^{54} -abhängig. Auch die MDH von *Methylobacterium extorquens* AM1 wird durch Zwei-Komponenten-Regulationssysteme (MxcQE und MxbDm) reguliert (Springer et al. 1997). Die Synthese der periplasmatischen Alkohol-Dehydrogenase von *Pseudomonas aeruginosa* wird ebenfalls durch ein Zwei-Komponenten-System (ExaDE) reguliert (Schobert und Görisch 2001).

Der genetische Kontext verschiedener *adh* Gene aus *Db. autotrophicum*, *Dt. psychrophila* und *Dv. vulgaris* (Durchführung der Analyse P. Wecker) ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Bei den drei Sulfatreduzierern konnten mehrere ADHs identifiziert werden, die möglicherweise nicht nur beim Abbau von Alkoholen, sondern z.B. auch beim fermentativen Wachstum, wenn Alkohole als Endprodukte ausgeschieden werden, eine Rolle spielen. Bei allen drei Organismen finden sich dazu in räumlicher Nähe zu den *adh* Genen solche für Zwei-Komponenten-Regulationssysteme. Eine Ausnahme stellt das *adh3* Gen bei *Dv. vulgaris* dar. Hier ist kein Regulationssystem zu finden. Für diese ADH, die in einem phylogenetischen Cluster mit der bei *Db. autotrophicum* identifizierten ADH liegt, konnte gezeigt werden, dass sie konstitutiv exprimiert wird (Haveman et al. 2003). Dies unterstützt die These, dass die identifizierte *Db. autotrophicum* ADH tatsächlich vom benachbart kodierten Zwei-Komponenten-Regulationssystem reguliert wird. Es zeigt aber auch, dass sich aus der Verwandtschaftsanalyse der ADHs allein keine Rückschlüsse auf ihre Rolle im Stoffwechsel oder auf gemeinsame Regulationsprinzipien ziehen lassen.

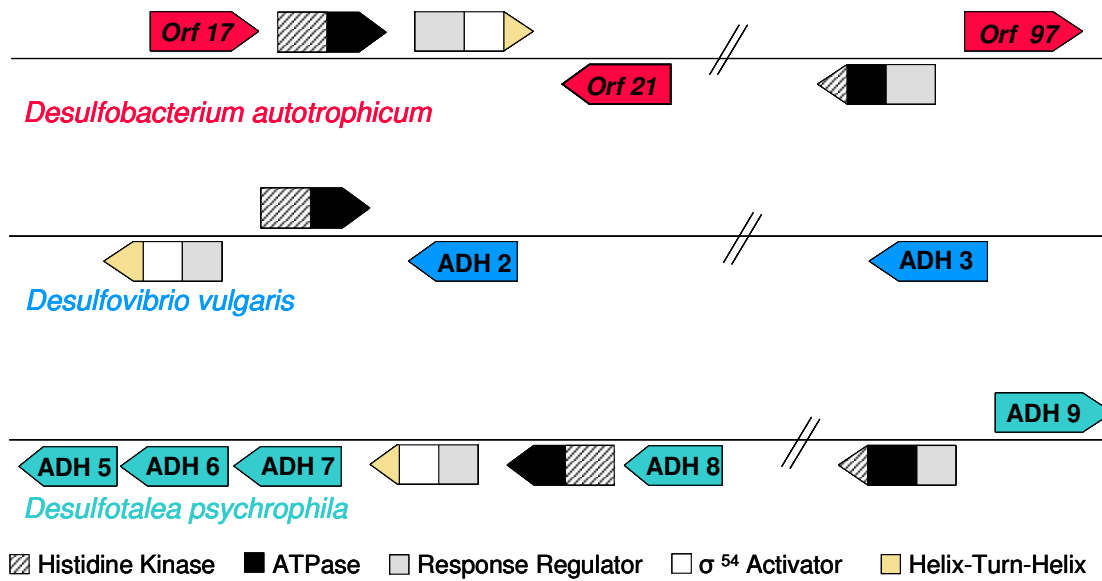


Abbildung 4.2 Gene regulatorischer Elemente in unmittelbarer Nachbarschaft von *adh* Genen bei *Db. autotrophicum* (rot), *Dv. vulgaris* (blau) und *Dt. psychrophila* (grün). Auch die verschiedenen Domänen der regulatorischen Elemente (Histidin Kinase, ATPase, Response Regulator, Aktivator Helix-Turn-Helix) sind farblich voneinander abgesetzt.

Trotzdem bleibt die Annahme, dass dieses System tatsächlich die identifizierte ADH reguliert, spekulativ, denn bei der vergleichenden Analyse der verschiedenen SRB konnte eine Veränderung der Proteinmuster auch bei *Dt. psychrophila* nicht nachgewiesen werden, obwohl hier Zwei-Komponenten-Systeme in unmittelbarer Nachbarschaft von *adh* Genen identifiziert werden konnten.

4.3 Regulation der Methylmalonyl-CoA-Mutase

Die Methylmalonyl-CoA Mutase ist ein Schlüsselenzym des Propionatabbaus und somit auch des Abbaus von 1-Propanol. Sie katalysiert die Transformation von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA. Die Regulation der Expression der Methylmalonyl-CoA-Mutase sollte nun mit Blick auf die Regulation der identifizierten ADH betrachtet werden. Es wurden auch physiologische Experimente zur Propionatverwertung durchgeführt.

4.3.1 Physiologische Experimente

Es wurden Wachstumsexperimente mit einem Substratgemisch (Laktat und Propionat) durchgeführt. Beim Abbau von Laktat wurde Acetat ausgeschieden und die Verwertung von Propionat setzte erst nach dem Verbrauch von Laktat ein. Eine weitere Zunahme der

Zelldichte fand hier allerdings nicht statt. Im Gegensatz zum Wachstumsexperiment mit einem Gemisch aus Laktat und 1-Propanol wird hier der Abbau von Propionat durch die Anwesenheit von Laktat unterdrückt, d.h. in diesem Fall ist Laktat eindeutig das bevorzugte Substrat. Dieser Befund ist allerdings nicht überraschend, da Propionat von *Db. autotrophicum* nur schlecht verwertet wird, wenn es als alleinige organische Kohlenstoffquelle vorliegt. In die gleiche Richtung deuteten Wachstumsversuchen mit verschiedenen Konzentrationen von 1-Propanol. Sie haben gezeigt, dass selbst bei der niedrigsten 1-Propanol Konzentration (5 mmol/l) die Verwertung des zuvor ausgeschiedenen Propionats nicht zu einer Zunahme der optischen Dichte, d.h. zu Wachstum führte. *Db. autotrophicum* ist also nicht in der Lage Propionat vergleichsweise produktiv zu verwerten. Dies trifft auch auf Acetat zu. Es gibt eine Reihe von Sulfatreduzierern, die in der Lage sind Acetat vollständig zu oxidieren, mit Acetat als Substrat jedoch nur langsam und schlecht wachsen (Rabus et al. 1999). Andere SRB wie z.B. *Desulfococcus* sind in der Lage mit Propionat zu wachsen. Auch hier wird Propionat über Methylmalonyl-CoA zunächst zu Pyruvat und dann zu Acetyl-CoA abgebaut, das dann vollständig über den C1 Stoffwechselweg zu CO₂ endoxidiert wird (Stieb und Schink 1989). Die Abbauwege von *Desulfococcus* und *Db. autotrophicum* sind durchaus vergleichbar, wenngleich sie Propionat unterschiedlich gut verwerten können. Über die schlechtere Verwertung von Propionat durch *Db. autotrophicum* kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Zum einen könnte es sein, dass der Transport von Propionat in die Zelle nicht effizient genug ist. Unvorteilhaft könnte sich auch der Energieaufwand, der zur Aktivierung von Propionat oder Acetat nötig ist, auswirken. Eine Aktivierung ist jedoch auch bei Butyrat und anderen höheren Fettsäuren, die über den β -Oxidationsweg abgebaut werden, notwendig. Für *Db. autotrophicum* konnte man feststellen, dass pro Mol Butyrat ein Mol Acetat ausgeschieden wird. Der Abbau von Butyrat liefert zwei Acetyl-CoA und es wurde vorgeschlagen, dass ein Molekül Acetyl-CoA in einer CoA Transferasereaktion dazu dient, Butyrat zu aktivieren. Das Acetat wird dann ausgeschieden (Schauder et al. 1986). Propionat kann nicht auf diesem Weg aktiviert werden und vielleicht sind andere Aktivierungsmechanismen bei *Db. autotrophicum* weniger effizient als bei Sulfatreduzierern, die zu produktivem Wachstum mit Propionat fähig sind.

4.3.2 Expressionsstudien

Die Repression der Verwertung von Propionat in Gegenwart von Laktat wurde auch in den durchgeführten Real-Time RT-PCR Experimenten deutlich. Dabei zeigte sich, dass die Expression der Methylmalonyl-CoA-Mutase (*mut*) in mit 1-Propanol gewachsenen Zellen induziert war, während sie in Zellen, die mit dem Gemisch aus Laktat und 1-Propanol gewachsen waren, nicht signifikant höher war als in allein mit Laktat gewachsenen Zellen. Dies war nicht unerwartet, da 1-Propanol größtenteils nur bis zum Propionat oxidiert wird. Die Zellen wurden jeweils in der Mitte der exponentiellen Phase geerntet, also zu einem Zeitpunkt, da 1-Propanol möglicherweise verbraucht, Laktat aber noch vorhanden war. Da Laktat jedoch das bevorzugte Substrat ist, wurde die Expression der Enzyme zum Abbau von Propionat noch nicht induziert. Das Transkript des *mut* Gens ließ sich auch in mit Laktat gewachsenen Zellen nachweisen. Dieser Grundlevel an Expression ist offenbar ausreichend, um einen Teil des 1-Propanols weitgehend vollständig zu oxidieren, wie die in den Wachstumsversuchen festgestellten Verhältnisse von 1-Propanol zu Propionat nahelegen. Die signifikant verstärkte Expression des *mut* Gens beim Wachstum mit Propanol liegt vermutlich an der Abwesenheit von Laktat. Ob 1-Propanol bzw. Propionat in der Lage sind als Induktor zu wirken, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

Bei einigen Bakterien besteht die Methylmalonyl-CoA-Mutase aus einer großen und einer kleinen Untereinheit (Birch et al. 1993; Bott et al. 1997). Die Funktion der kleinen Untereinheit ist dabei jedoch ungeklärt, sie weist weder Cofaktor- noch Substratbindestellen auf (Mancia et al. 1999). Es gibt allerdings auch Beispiele für Methylmalonyl-CoA-Mutasen, die als Homodimere vorliegen. Dies ist z.B. bei *Sinorhizobium melioli* der Fall (Charles und Aneja 1999). Auch das Sbm Protein bei *E. coli*, das höchstwahrscheinlich als Methylmalonyl-CoA-Mutase funktioniert, besitzt nur eine Untereinheit (Roy und Leadly 1992). Die Methylmalonyl-CoA-Mutase von Säugetieren liegt ebenfalls als Homodimer vor. Die einzelnen Untereinheiten weisen in diesen Fällen die größte Ähnlichkeit zur α -Untereinheit anderer bakterieller Methylmalonyl-CoA-Mutasen auf. Das bei *Db. autotrophicum* gefundene *mut* Genprodukt hat größte Ähnlichkeit zur α -Untereinheit der Methylmalonyl-CoA-Mutase aus *Leptospira interrogans*. Die eindeutige Funktionszuweisung wird außerdem durch das Vorhandensein einer typischen Signatursequenz und einer Bindestelle für den Cofaktor Cobalamin unterstützt. Man kann davon ausgehen, dass die Methylmalonyl-CoA-Mutase auch bei *Db.*

autotrophicum nur aus einer Untereinheit besteht, die möglicherweise ebenfalls als Homodimer funktional ist.

Es konnte gezeigt werden, dass das Gen für die Methylmalonyl-CoA-Mutase reguliert wird, wenngleich unabhängig von der des *adh* Gens.

4.4 Untersuchung CO-Dehydrogenase kodierender Gene in *Desulfobacterium autotrophicum*

Im Genom von *Db. autotrophicum* konnten verschiedene Gene, die für eine Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CODH) kodieren, identifiziert werden. Zwei davon kodieren nur für eine einzelne Untereinheit und ihr genetischer Kontext erlaubt keine sinnvollen metabolischen Schlussfolgerungen. Bei der dritten Kohlenmonoxid-Dehydrogenase handelt es sich um eine bifunktionelle Acetyl-CoA-Synthase/Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (ACS/CODH) mit vier verschiedenen Untereinheiten. In der näheren Umgebung dieser Gene ließen sich Gene für Enzyme des C1-Wegs identifizieren. Die Gene für die ACS/CODH sind in einer operonartigen Struktur angeordnet. Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, werden CODHs in vier verschiedene Klassen eingeteilt, von denen drei multifunktionale Enzyme mit mehreren Untereinheiten beinhalten. Die vierte Klasse umfasst monofunktionale Enzyme die als Homodimere vorliegen (Lindahl 2002). Die beiden einzelnen Gene besitzen beide eine hohe Ähnlichkeit zur katalytischen Untereinheit der CODH von *Methanosarcina mazei*. Die vier verschiedenen Gene des dritten Genclusters weisen eine hohe Ähnlichkeit mit den ACS/CODH Genen von *Clostridium thermoaceticum* auf (Morton et al. 1991). Bei *Clostridium thermoaceticum* sind die Gene jedoch deutlich anders angeordnet. Hier schließt sich an die Gene, die α - und β - Untereinheit der CODH kodieren, das Gen für die große Untereinheit des Corrinoid-Eisen-Schwefel Proteins an. Letzteres ist durch einen nicht-kodierenden Bereich vom Gen der kleinen Untereinheit des Corrinoid-Eisen-Schwefel Proteins getrennt. Im Anschluss daran befindet sich ein Gen für eine Methyltransferase (Lu et al. 1993). Die abweichende Genanordnung bei *Db. autotrophicum* wurde bereits in Abb. 3.15 dargestellt. Die ACS/CODH von *Db. autotrophicum* lässt sich jedoch ebenfalls den Klasse III CODHs zurechnen.

Die Tatsache, dass *Db. autotrophicum* offenbar über drei verschiedene CODHs verfügt ist ungewöhnlich, jedoch nicht einzigartig. So konnten auch bei *Methanosarcina*

frisia zwei Gencluster identifiziert werden, in denen jeweils eine CODH kodiert wird (Eggen et al. 1996). Beide Cluster beinhalten die Gene für α - und β -Untereinheit einer CODH. Die entsprechenden Genprodukte haben zueinander eine höhere Sequenzähnlichkeit als zu CODHs aus anderen Organismen. Organismen mit mehreren *codh* Genen besitzen zuweilen CODHs aus verschiedenen Klassen oder Unterklassen und manche Autoren gehen davon aus, dass die verschiedenen Unterklassen der CODHs unterschiedliche physiologische Funktionen übernehmen (Lindahl 2002). Tabelle 4.3 zeigt den Anteil identischer Aminosäuren der verschiedenen *Db. autotrophicum* CODHs, im Vergleich (i) untereinander, (ii) mit der CODH von *Dv. vulgaris* und (iii) mit ihren besten BLAST Treffern. Die Produkte der beiden einzelnen *codh* Gene sind zueinander weniger ähnlich als zur ACS/CODH. Jedoch ist die CODH2 ähnlicher zur CODH von *Dv. vulgaris* als zur ACS/CODH, während es sich für die CODH1 umgekehrt verhält. Die katalytische Untereinheit der ACS/CODH ist der CODH aus *Dv. vulgaris* am wenigsten ähnlich. Die CODH1 hat ihre höchste Ähnlichkeit zu ihrem besten BLAST Ergebnis während die CODH2 der katalytischen Untereinheit der ACS/CODH am ähnlichsten ist und umgekehrt.

Tabelle 4.3 Anteil identischer Aminosäuren der CODH1, CODH2 und ACS/CODH von *Db. autotrophicum*, im Vergleich untereinander und mit anderen Proteinen.

	CODH1	CODH2	ACS/CODH (β)
CODH1	100 %		
CODH2	46 %	100 %	
ACS/CODH (β)	49 %	53 %	100 %
DvH CODH	51 %	45 %	41 %
<i>M. frisia</i> (I) ^{a)}	19 %	18 %	
<i>M. frisia</i> (II) ^{a)}	20 %	21 %	
<i>M. thermophila</i> (I) ^{a)}	29 %	20 %	
<i>M. thermophila</i> (II) ^{a)}	20 %	19 %	
<i>R. rubrum</i> ^{b)}	48 %	36 %	
<i>M. mazei</i> (β) ^{c)}	68 %	45 %	
<i>M. acetivorans</i> (β) ^{c)}			51 %

a) Organismen mit zwei CODHs (bezeichnet mit I und II)

b) Expression dieser CODH ist in Abhängigkeit von Kohlenmonoxid reguliert

c) bester BLAST Hit

Die unterschiedlichen Ähnlichkeitswerte von CODH1 und CODH2 deuten möglicherweise auf unterschiedliche Funktion hin, ungeachtet ihrer gemeinsamen Zugehörigkeit zur Klasse IV der CODHs.

Die Expression der verschiedenen CODH Gene von *Db. autotrophicum* wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Real-Time RT-PCR untersucht. Die beiden Gene von CODH1, CODH2 und der großen Untereinheit der multimeren ACS/CODH waren unter allen getesteten Wachstumsbedingungen (Laktat, H₂/CO₂ und H₂/CO₂ + Acetat) exprimiert. Die Expressions-Niveaus beim Wachstum mit Laktat bzw. mit H₂/CO₂ wurden miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Gene der großen Untereinheit der multimeren CODH unter beiden Bedingungen in gleichem Maße exprimiert, während die Gene von CODH1 und CODH2 beim Wachstum mit Laktat stärker exprimiert waren. Auch bei anderen Organismen gibt es experimentelle Untersuchungen zur Regulation von CODH Genen. So war z.B. nur eines der beiden CODH Gene bei *Methanosarcina frisia* in mit Acetat gewachsenen Zellen exprimiert. Die Regulation findet hier auf transkriptioneller Ebene statt (Eggen et al. 1996). Auch die Expression der CODH bei *Methanosarcina thermophila* ist abhängig von Acetat reguliert. Sie ist bei Wachstum mit Acetat stärker exprimiert als bei Wachstum mit anderen Substraten wie z.B. Methanol (Sowers et al. 1993). Die Expression der CODH bei *Rhodospirillum rubrum* wird in Abhängigkeit des Vorhandenseins von ihrem Substrat Kohlenmonoxid reguliert und nur bei Vorhandensein von Kohlenmonoxid exprimiert (Shelver et al. 1995). Die *codh* Gene dieser Organismen zeigen keine hohe Sequenzähnlichkeit zu den Genen aus *Db. autotrophicum*.

Auch bei anderen Sulfatreduzierern kommen CODHs vor. So verfügt z.B. *Archaeoglobus fulgidus* über einen ACS/CODH Komplex aus fünf Untereinheiten (Klenk et al. 1997). Auch im Genom von *Dv. vulgaris* Stamm Hildenborough konnte ein Gen für eine CODH identifiziert werden. Außerdem wurde hier ein membrangebundener Hydrogenase-Komplex identifiziert, der hohe Ähnlichkeit mit dem entsprechenden Komplex aus *Rhodospirillum rubrum* aufweist. Dieser Komplex katalysiert, zusammen mit der CODH, die Umsetzung von Kohlenmonoxid und Wasser zu Kohlendioxid und Wasserstoff. Die Autoren vermuten, dass die CODH und der entsprechende Hydrogenasekomplex am Wasserstoffcycling beteiligt sein könnten (Heidelberg et al. 2004). Analog zu dieser These könnte bei *Db. autotrophicum* CODH1 oder CODH2 im Zusammenwirken mit einem membrangebunden Hydrogenasekomplex die Generierung von Wasserstoff und Kohlendioxid aus Kohlenmonoxid und Wasser katalysieren. Die andere CODH könnte die umgekehrte Reaktion katalysieren und so auch das aus der

Decarboxylierung von Pyruvat stammende CO₂ zu Kohlenmonoxid umwandeln. Falls das Wasserstoffcyclingmodell zutrifft, würde dies eine Induktion der Expression beim Wachstum mit Laktat erklären. Es konnte bei *Db. autotrophicum* ein membrangebundener Hydrogenasekomplex identifiziert werden, der große Ähnlichkeit zum Hydrogenase-4-Komplex aus *Escherichia coli* aufweist. Eine Rolle bei der Endoxidation von Acetat, was ebenfalls eine verstärkte Expression beim Wachstum mit Laktat erklären würde, können CODH1 und CODH2 alleine nicht übernehmen. Denkbar wäre, dass sie in der Lage sind die katalytische Untereinheit der ACS/CODH zu ersetzen, die dann möglicherweise eher auf den Abbau von Acetat als auf die Generierung von Acetat spezialisiert wäre. Für *Dv. vulgaris* wurde die Bedeutung der Generierung von CO hervorgehoben, da es für die Synthese aktiver Hydrogenasen notwendig ist (Voordouw 2002). Auch hier könnten die identifizierten CODHs eine Rolle spielen.

4.5 Zusammenfassende Betrachtung – Regulation des Alkoholabbaus und weiterführender Stoffwechselwege

Einen Überblick über die bislang diskutierten regulatorischen Vorgänge im Kontext der entsprechenden Stoffwechselwege ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

Die initiale Oxidation von Ethanol, 1-Propanol und 1-Butanol erfolgt durch dieselbe ADH. Die Expression des entsprechenden *adh* Gens erfolgt in Gegenwart der Substrate, vermutlich mit Hilfe eines Zwei-Komponenten-Regulationssystems. Die gleichzeitige Gegenwart von Laktat reprimiert die *adh* Expression nicht. Der weiterführende Weg des Abbaus von 1-Propanol ist der Methylmalonyl-CoA Weg, bei dem das Intermediat Propionat zu Pyruvat umgesetzt wird. Die Identifizierung des *mut* Gens der Methylmalonyl-CoA-Mutase im Genom von *Db. autotrophicum* erlaubte es sein Expressionsverhalten mit dem des *adh* Gens zu vergleichen. Eine direkte Korrelation der Expression beider Gene konnte nicht festgestellt werden. Bei Anzucht mit einem Gemisch aus Laktat und 1-Propanol war das *adh* Gen exprimiert, nicht aber das *mut* Gen. Dies deutet auf grundlegend verschiedene Regulationsmechanismen für diese beiden Gene hin.

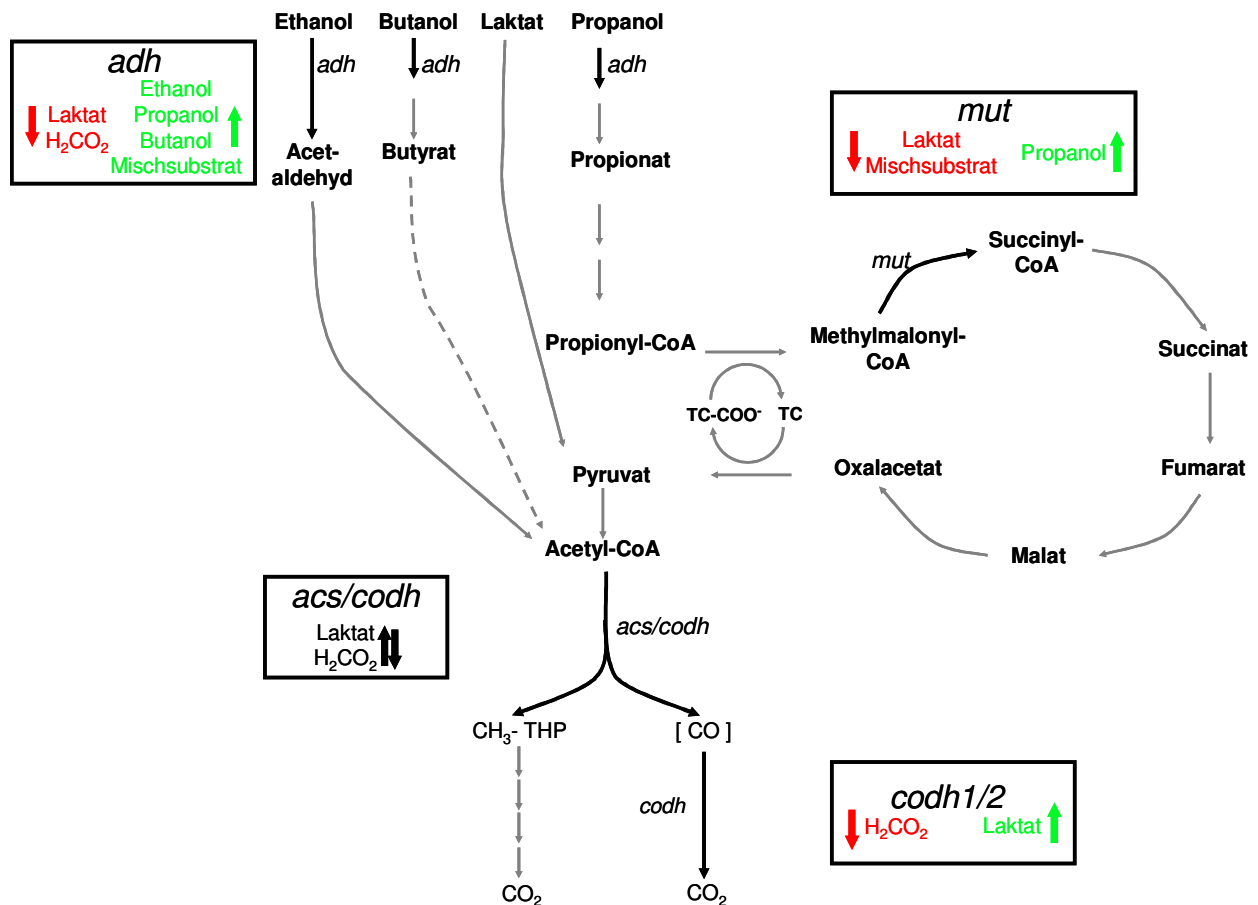


Abbildung 4.3 Expression ausgewählter Gene von *Db. autotrophicum*. Die Reaktionsschritte der untersuchten Gene sind hervorgehoben (schwarz). Eine verstärkte Expression ist durch grüne Farbe, eine verminderte Expression durch rote Farbe und ein konstantes Expressionslevel ist durch schwarze Farbe gekennzeichnet.

Die Expression von drei Genen, die für eine CODH kodieren, wurde ebenfalls untersucht. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass alle Gene exprimiert werden. Während die ACS/CODH unter den betrachteten Bedingungen gleichmäßig exprimiert wird, sind die beiden anderen monofunktionalen CODHs beim Wachstum mit Laktat stärker exprimiert.

4.6 Metabolische Rekonstruktion ausgesuchter Stoffwechselwege bei *Desulfobacterium autotrophicum*

Es wurde in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, die Stoffwechselwege, die das Schicksal der untersuchten Substrate (Alkohole und Laktat) bestimmen und in die die untersuchten Gene eingebettet sind, zu rekonstruieren. Ein weiterer Fokus lag auf dem Energiestoffwechsel, da die APS-Reduktase ebenfalls experimentell nachgewiesen werden

konnte. Weitere zentrale Proteine wie Hydrogenasen und Cytochrome vervollständigen das Bild. Tabelle 4.4 fasst die gesammelten Ergebnisse zusammen und stellt sie in einen vergleichenden Zusammenhang mit der Genausstattung von *Dt. psychrophila*, *Dv. vulgaris* und *Archaeoglobus fulgidus*.

In unmittelbarer Nähe der *apr* Gene (APS Reduktase) konnten Gene für eine mögliche Heterodisulfidreduktase, sowie Gene für die α -Untereinheiten dieser Enzyme identifiziert werden. Heterodisulfidreduktasen findet man bei Archaeobakterien. So konnte z.B. bei *Archaeoglobus fulgidus* der Hme-Komplex identifiziert werden, ein Komplex aus fünf Untereinheiten, der beim transmembranen Elektronentransport eine Rolle spielt (Mander et al. 2002). Die α -Untereinheit der APS-Reduktase konnte auf 2DE Gelen identifiziert werden und war unter autotrophen Wachstumsbedingungen abundanter. Eine verstärkte Expression der APS-Reduktase bei Wachstum mit H_2 als Elektronendonator wurde auch schon bei *Desulfovibrio* beschrieben (Steger et al. 2002). Gleiches konnte auch für andere an Redoxprozessen beteiligte Enzyme gefunden werden (Steger et al. 2002).

Im Genom von *Db. autotrophicum* wurden Gene für [NiFeSe]- und [NiFe]-Hydrogenasen, nicht aber für [Fe]-Hydrogenasen gefunden. Diese kommen hingegen bei *Dv. vulgaris* vor. Auch Gene, deren Produkte für die Reifung von Hydrogenasen zuständig sind, konnten im Genom von *Db. autotrophicum* identifiziert werden. Es wurden insgesamt fünf verschiedene Gencluster mit Hydrogenasegenen identifiziert. Ein Gencluster enthält neben den Genen für eine kleine und eine große Untereinheit einer [NiFe]-Hydrogenase, noch drei Gene mit Ähnlichkeit zu verschiedenen Membrankomponenten der Hydrogenase 4 von *E. coli*, sowie ein *echC* ähnliches Gen. Solche membrangebundenen Hydrogenasekomplexe wurden auch bei *Dv. vulgaris* (Heidelberg et al. 2004) und bei *Dv. gigas* gefunden. Hier wird diesem Hydrogenasekomplex eine Rolle beim H_2 -Cycling zugeschrieben (Rodrigues et al. 2003). Während Untereinheiten der [NiFe]-Hydrogenase bei *Db. autotrophicum* weder über ein Signalpeptid, noch über ein Twin-Arginin-Motiv verfügen, sind für die anderen Genprodukte des Clusters Signalpeptide und Transmembranhelices vorhergesagt. In diesen Fällen liegt eine Membranlokalisierung nahe. Die Hydrogenase 4 bei *E. coli* ist ein Proteinkomplex aus 10 Untereinheiten (Skibinski et al. 2002) und die Expression dieser Gene wird beim Wildtyp in Frage gestellt (Self et al. 2004). Die integralen Membranuntereinheiten der Hydrogenase 4, wie sie auch bei *Db. autotrophicum* identifiziert werden konnten, weisen eine Verwandtschaft mit NADH: Quinonoxidoreduktasen auf.

Bei allen anderen gefundenen Hydrogenasegenen verfügt jeweils das Gen für die kleine Untereinheit über ein Twin-Arginin-Motiv, was für eine periplasmatische Lokalisation der entsprechenden Genprodukte spricht. Es konnten also keine löslichen cytoplasmatischen Hydrogenasen identifiziert werden wie dies z.B. bei *Dt. psychrophila* der Fall ist (Rabus et al. 2004). Deren Funktion könnte jedoch von den Hydrogenasekomponenten des Komplexes übernommen werden, falls diese auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert sind, wie dies für *Dv. vulgaris* und den Ech-Hydrogenasekomplex diskutiert wird (Heidelberg et al. 2004).

Bei *Db. autotrophicum* konnte kein Transmembrankomplex identifiziert werden, der zu dem Hmc-Komplex bei *Dv. vulgaris* homolog wäre. Der Hmc-Komplex ist Membran-lokalisiert und besteht aus verschiedenen Untereinheiten. Man nimmt an, dass die Cytochrom-Untereinheit Elektronen von Tetrahäm Cytochrom c_3 akzeptiert und zur dissimilatorischen Sulfatreduktion weiterleitet (Czjzek et al. 2002; ElAntak et al. 2003).

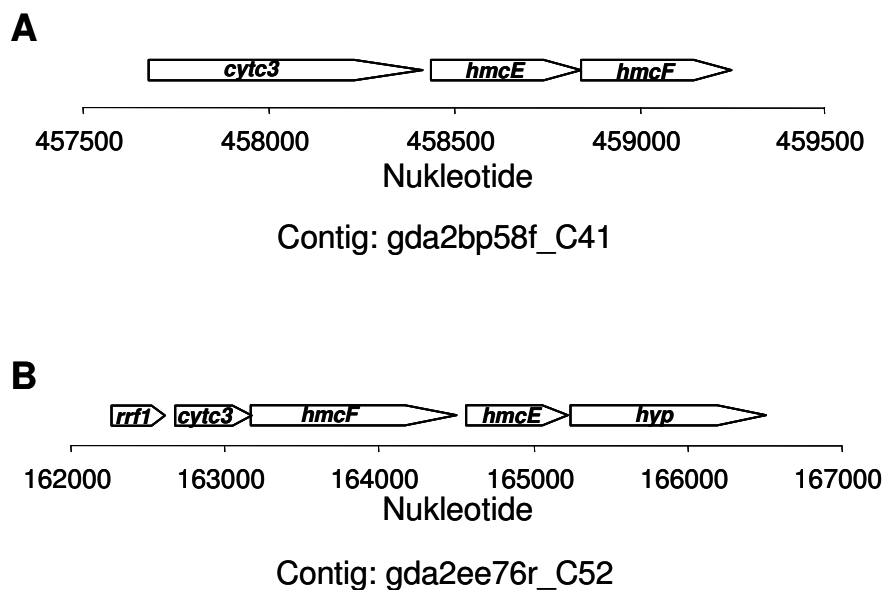


Abbildung 4.4 Gencluster I (A) und Gencluster II (B) bei *Db. autotrophicum*. Bei beiden liegen Gene für ein saures c_3 -Typ Cytochrom (*cyt c3*) in einer operonähnlichen Struktur mit zwei Hmc-Komplex Genen (*hmcE*, *hmcF*) vor. Teil von Gencluster II sind außerdem noch ein Regulatorprotein Gen (*rrf1*) und ein konserviertes hypothetisches Protein (*hyp*).

Allerdings konnten im Genom von *Db. autotrophicum* insgesamt zwei Cytochrome identifiziert werden, die in einer operonähnlichen Struktur mit zwei Genen vorliegen, die eine hohe Ähnlichkeit mit *hmcF* und *hmcE* aufweisen. Diese beiden Gencluster sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Sie werden im Folgenden als Gencluster I (Abb. 4.4 A) und Gencluster II (Abb. 4.4 B) bezeichnet. Für die *hmcE* ähnlichen Gene bei *Db.*

autotrophicum wurden jeweils fünf Transmembranhelices vorhergesagt, was eine Lokalisation in der Membran wahrscheinlich macht. Bei den Cytochrom bei *Db. autotrophicum* Genen handelt es sich jeweils um ein Gen, das hohe Ähnlichkeit zum „acidic“ Cytochrom c_3 von *Desulfovibrio africanus* aufweist (Pieulle et al. 1996). Dieses ist ein Tetrahäm Cytochrom c_3 , das sich durch besonders viele saure Aminosäurereste und durch eine geringere Aktivität gegenüber der [NiFeSe]-Hydrogenase auszeichnet. Die Aktivität kann durch Zugabe von basischem Tetrahäm Cytochrom c_3 gesteigert werden (Pieulle et al. 1996). Die Untersuchung weiterer Hydrogenasen anderer Sulfatreduzierer ergab ähnlich niedrige Aktivitäten, die durch Zugabe von Tetrahäm c_3 gesteigert werden konnte. Man nimmt deswegen an, dass dieses Cytochrom nicht direkt Elektronen von den Hydrogenasen übernimmt, sondern dass das basische Tetrahäm Cytochrom c_3 zwischengeschaltet ist (Margo et al. 1997). Auch bei *Dv. vulgaris* konnte ein solches „acidic“ Cytochrom gefunden werden. Aufgrund dieser Tatsache wurden die Tetrahäm c_3 Cytochrome in zwei Familien unterteilt: TypI- c_3 und TypII- c_3 , wobei erstere den vorher bereits bekannten Tetrahäm Cytochromen entsprechen und unter letzterem Begriff die sauren Cytochrom c_3 Typen zusammengefasst werden. Bei *Dv. vulgaris* liegt dieses Cytochrom, analog zu den Verhältnissen bei *Db. autotrophicum*, in einem Cluster mit Genen, die große Ähnlichkeit zu *hmcE* und *hmcF* aufweisen. Ebenso wie das Cytochrom von *Db. autotrophicum* verfügt auch das Cytochrom von *Dv. vulgaris* über ein Signalpeptid, was auf eine periplasmatische Lokalisation hinweist. Ebenso wie bei *Dv. africanus* wurde bei *Dv. vulgaris* gegenüber Hydrogenasen eine verminderte Aktivität festgestellt, der Effekt ist jedoch weitaus weniger deutlich ausgeprägt als beim sauren Cytochrom c_3 aus *Desulfovibrio africanus* (Valente et al. 2001). Abbildung 4.5 stellt den Hmc- und TpII- c_3 -Komplexen aus *Dv. vulgaris* einen möglichen TpII- c_3 -Komplex gegenüber. Hier entspricht der Komplex in Aufbau und Struktur dem TpII- c_3 -Komplex bei *Dv. vulgaris*, was eine ähnliche Funktion wahrscheinlich macht. Da bei *Db. autotrophicum* nur Gene für einen möglichen TpII- c_3 -Komplex gefunden wurden, ein Gencluster für einen vollständigen Hmc-Komplex aber fehlt, könnte es sein, dass dieser TpII- c_3 -Komplex hier ganz die Rolle des Hmc-Komplexes übernimmt.

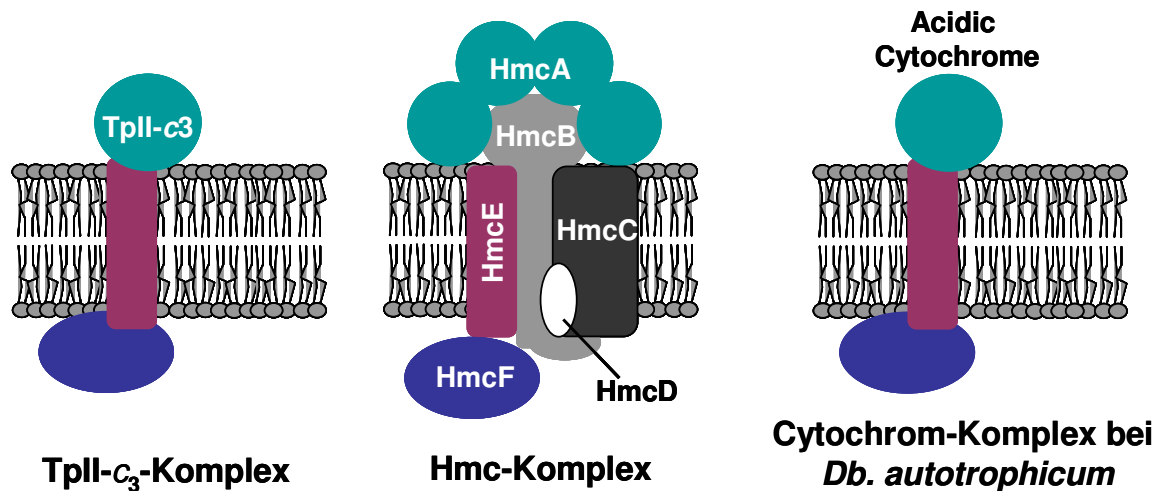


Abbildung 4.5 Schematische Darstellung verschiedener Transmembrankomplexe bei Sulfatreduzierern. Homologe Domänen sind in gleichen Farbtönen dargestellt. Gezeigt sind der TpII- c_3 -Komplex und der Hmc-Komplex von *Dv. vulgaris*, sowie ein möglicher TpII- c_3 -Komplex bei *Db. autotrophicum*.

Der Hmc-Komplex konnte bisher nur bei *Desulfovibrio* Spezies identifiziert werden, während bei anderen Sulfatreduzierern andere Transmembrankomplexe an denen Cytochrome beteiligt sind gefunden wurden. So z.B. der 9hcc-Komplex bei *Desulfovibrio desulfuricans* (Matias et al. 1999a; Matias et al. 1999b; Saraiva et al. 2001) oder der Qmo-Komplex bei *Desulfovibrio desulfuricans* (Pires et al. 2003), für die eine dem Hmc-Komplex entsprechende Funktion vorgeschlagen wurde.

In unmittelbarer Nähe von Gencluster II von *Db. autotrophicum* konnte außerdem ein Gen mit Ähnlichkeit zum *rrf1* Gen aus *Dv. vulgaris* identifiziert werden (siehe Abb. 4.4B). Bei *Dv. vulgaris* kodiert *rrf1* für ein regulatorisches Protein (Rrf1), das zur CheY Familie der Response-Regulatoren gehört (Rossi et al. 1993). Neben *rrf1* findet sich bei *Dv. vulgaris* allerdings noch ein Gen für ein zweites Regulatorprotein (*rrf2*) in unmittelbarer Nähe des Hmc-Clusters (Rossi et al. 1993). Beim Genprodukt von *rrf2* handelt es sich um ein DNA-Bindeprotein. Da eine Deletion dieser beiden Gene dazu führte, dass das Hmc-Operon verstärkt exprimiert wurde, geht man davon aus, dass sie in die Regulation der Expression des Hmc-Operons involviert sind. Allerdings werden noch weitere Regulationsmechanismen zusätzlich zur Regulation durch Rrf1/2 vermutet (Keon et al. 1997).

In der vorläufigen genomischen Sequenz von *Db. autotrophicum* konnte ein weiteres saures Cytochrom identifiziert werden. Es liegt in einem Gencluster mit Genen, die große Ähnlichkeit mit Genen eines mit Nitrogenase assoziierten

Elektronentransportkomplexes aufweisen (*rnfCDGA*). Dieses Gencluster von *Db. autotrophicum* ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Bei diesem Komplex handelt es sich um einen Transmembrankomplex der zunächst bei *Rhodobacter capsulatus* entdeckt wurde. Er ist hier an der Stickstofffixierung beteiligt und leitet Elektronen aus dem membrangebundenen Elektronentransportsystem ins Cytoplasma weiter (Kumagai et al. 1997). Der Komplex weist Homologien zu NADH Oxidoreduktasen auf und Homologe wurden auch in Bakterien gefunden, die nicht zu Stickstofffixierung in der Lage sind, wo sie mit hoher Wahrscheinlichkeit andere Funktionen übernehmen (Jouanneau et al. 1998).

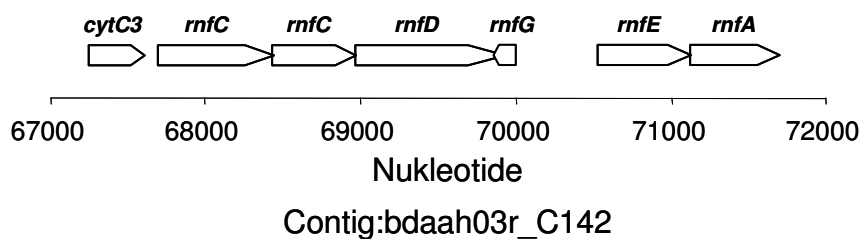


Abbildung 4.6 *c*₃-Cytochrom Gen (*cytc3*) in einem Cluster mit *rnf*-Genen (*rnfCDGEA*).

Außerdem konnte bei *Db. autotrophicum* ein Cytochrom mit hoher Ähnlichkeit zu C₅₅₄ bei *Rhodopirellula baltica* identifiziert werden. Dem Cytochrom bei *Db. autotrophicum* fehlt ein Signalpeptid und es verfügt auch über kein Twin-Arginin-Motiv, das einen alternativen Transport ins Periplasma sicherstellen könnte. Somit ist für dieses Cytochrom eine cytoplasmatische Lokalisation wahrscheinlich und es könnte dort den Transport von Elektronen von den beschriebenen Transmembrankomplexen zur dissimilatorischen Sulfatreduktion übernehmen.

Tabelle 4.4 Vergleichende Genomanalyse von *Desulfobacterium autotrophicum*, *Desulfotalea psychrophila*, *Desulfovibrio vulgaris* und *Archaeoglobus fulgidus*.

Gen	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> ^a			<i>Dt. psychrophila</i> ^b	<i>Dv. vulgaris</i> ^b	<i>A. fulgidus</i> ^b	
	BLAST Hit für die Annotation	Organismus	E-Wert				
Periplasmatische Hydrogenasen^c							
<i>hysA</i>	[NiFe] Hydrogenase	[NiFe] Hydrogenase (kleine UE ^d)	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	9e ⁻⁹⁶	+	+	-
<i>hysB</i>	[NiFe] Hydrogenase	[NiFe] Hydrogenase (große UE ^d)	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	1e ⁻¹⁷⁴	+	+	-
<i>hndA</i>	[NiFeSe] Hydrogenase	[NiFeSe] Hydrogenase (kleine UE ^d)	<i>Desulfovibrio baculatus</i>	1e ⁻¹⁰⁷	+	+	-
<i>hndB</i>	[NiFeSe] Hydrogenase	[NiFeSe] Hydrogenase (große UE ^d)	<i>Desulfovibrio baculatus</i>	1e ⁻¹⁶⁸	+	+	-
<i>frcG</i>	F420 nicht reduzierende Hydrogenase	F420 nicht reduzierende Hydrogenase Gamma	<i>Methanopyrus kandleri</i>	1e ⁻⁵⁶	-	-	+
<i>frcD</i>	F420 nicht reduzierende Hydrogenase	F420 nicht reduzierende Hydrogenase	<i>Methanopyrus kandleri</i>	6e ⁻⁷	-	-	+
<i>mvhD</i>	Methylviologen reduzierende Hydrogenase	Methylviologen reduzierende Hydrogenase (katalytische UE ^d)	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	3e ⁻⁴⁰	-	-	+
<i>hydA</i>	[Fe] Hydrogenase	-	-	-	-	+	-
<i>hydB</i>	[Fe] Hydrogenase	-	-	-	-	+	-
Cytoplasmatische Hydrogenasen							
<i>hynA</i>	[NiFe] Hydrogenase	-	-	-	+	+	-
<i>hynC</i>	[NiFe] Hydrogenase	-	-	-	+	+	-
<i>hynD</i>	[NiFe] Hydrogenase	-	-	-	+	+	-

Tabelle 4.4 (Fortsetzung)

Gen	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> ^a			<i>Dt.</i> <i>psychrophila</i> _b	<i>Dv.</i> <i>vulgaris</i> ^b	<i>A.</i> <i>fulgidus</i> ^b
	BLAST Hit für die Annotation	Organismus	E-Wert			
Membrankomplexe mit Hydrogenasen						
<i>echA</i>	Hydrogenase Komplex	-	-	-	+	-
<i>echB</i>	Hydrogenase Komplex	-	-	-	+	-
<i>echC</i>	Hydrogenase Komplex	-	-	-	+	-
<i>echD</i>	Hydrogenase Komplex	-	-	-	+	-
<i>echE</i>	Hydrogenase Komplex	-	-	-	+	-
<i>echF</i>	Hydrogenase Komplex	-	-	-	+	-
<i>cooM</i>	Hydrogenase Komplex	-	-	-	+	-
<i>cooL</i>	Hydrogenase Komplex	-	-	-	+	-
<i>cooK</i>	Hydrogenase Komplex	-	-	-	+	-
<i>cooX</i>	Hydrogenase Komplex	-	-	-	+	-
<i>cooU</i>	Hydrogenase Komplex	-	-	-	+	-
<i>cooH</i>	Hydrogenase Komplex	-	-	-	+	-
<i>cooF</i>	Hydrogenase Komplex	-	-	-	+	-

Tabelle 4.4 (Fortsetzung)

Gen	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> ^a			<i>Dt. psychrophila</i> ^b	<i>Dv. vulgaris</i> ^b	<i>A. fulgidus</i> ^b
	BLAST Hit für die Annotation	Organismus	E-Wert			
Mebrankomplexe mit Hydrogenasen						
<i>hyfF</i>	Hydrogenase 4 Komplex	Hydrogenase 4, Membran	<i>Escherichia coli</i>	1e ⁻⁶²	-	-
<i>hyfE</i>	Hydrogenase 4 Komplex	Hydrogenase, Membran	<i>Geobacter metallireducens</i>	3e ⁻³²	-	-
<i>hyfC</i>	Hydrogenase 4 Komplex	Hydrogenase 4 Formate Hydrogen Lyase	<i>Geobacter metallireducens</i>	5e ⁻⁷³	+	+
<i>hyfB</i>	Hydrogenase 4 Komplex	NADH dependent dehydrogenase UE ^d	<i>Dt. psychrophila</i>	1e ⁻¹⁰⁵	+	+
<i>hynA</i>	Ni-Fe Hydrogenase	Hydrogenase 4 Komplex (?)	<i>Geobacter metallireducens</i>	2e ⁻³³	-	-
<i>hynB</i>	Ni-Fe Hydrogenase	Hydrogenase 4 Komplex (?)	<i>Geobacter metallireducens</i>	4e ⁻⁶⁴	-	-
Reifungsproteine für Hydrogenasen						
<i>hypA</i>	Hydrogenase Ni Inkorporation	Hydrogenase Ni Inkorporation	<i>Streptomyces avermitilis</i>	1e ⁻¹⁷	+	+
<i>hypB</i>	Hydrogenase Expression / Reifung	Hydrogenase Expression / Reifung	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	1e ⁻⁵²	+	+
<i>hypC</i>	Hydrogenase Expression / Reifung	Hydrogenase Expression / Reifung	<i>Pyrococcus abyssi</i>	4e ⁻¹⁵	+	+
<i>hypD</i>	Hydrogenase Reifung	Hydrogenase Reifung	<i>Thermobacter tencongensis</i>	2e ⁻⁹⁹	+	+
<i>hypE</i>	Hydrogenase Expression / Reifung	Hydrogenase Expression / Reifung	<i>Anabaena virabilis</i>	1e ⁻⁹⁵	+	+
<i>hypF</i>	Hydrogenase Expression / Reifung	Hydrogenase Expression / Reifung	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	1e ⁻¹⁴⁹	+	+

Tabelle 4.4 (Fortsetzung)

Gen	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> ^a			<i>Dt. psychrophila</i> ^b	<i>Dv. vulgaris</i> ^b	<i>A. fulgidus</i> ^b
	BLAST Hit für die Annotation	Organismus	E-Wert			
Schwefel-Metabolismus						
<i>dsrA</i>	Dissimilatorische Sulfidreduktase (α -UE ^d)	DSR A	<i>Desulfobacula toluolica</i>	0.0	+	+
<i>dsrB</i>	Dissimilatorische Sulfidreduktase (β -UE ^d)	DSR B	<i>Desulfobacter vibrioformis</i>	0.0	+	+
<i>dsrD</i>	Dissimilatorische Sulfidreduktase (δ -UE ^d)	DSR D	<i>Desulfobacter vibrioformis</i>	3e ⁻²⁶	+	+
<i>dsrC</i>	Dissimilatorische Sulfidreduktase (γ -UE ^d)	DSR C	<i>Thermodesulforhabdus norvegica</i>	1e ⁻⁴⁰	+	+
<i>dsrN</i>	Corbyrinsäure a,c diamid Synthase	Corbyrinsäure a,c diamid Synthase	<i>Desulfobacter vibrioformis</i>	1e ⁻¹⁵³	+	+
<i>aprA</i>	APS-Reduktase (α -UE ^d)	APS Reduktase α -UE ^d	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	0.0	+	+
<i>aprB</i>	APS-Reduktase (β -UE ^d)	APS Reduktase β -UE ^d	<i>Chlorobium tepidum</i>	0.0	+	+
<i>sat</i>	Sulfat-Adenylyl- Transferase	Sulfat-Adenylyl-Transferase	<i>Entamoeba histolytica</i>	1e ⁻¹³⁸	+	+
<i>tst</i>	Thiosulfatreduktase	Thiosulfatreduktase	<i>Clostridium perfringens</i>	1e ⁻⁵⁵	+	+
<i>ppac</i>	Pyrophosphatase	Pyrophosphatase, Mangan abhängig	<i>Shewanella oneidensis</i>	1e ⁻¹¹¹	+	+
<i>sulP</i>	Sulfattransporter	Sulfattransporter	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	8e ⁻⁸²	+	-

Tabelle 4.4 (Fortsetzung)

Gen	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> ^a			<i>Dt. psychrophila</i> ^b	<i>Dv. vulgaris</i> ^b	<i>A. fulgidus</i> ^b	
	BLAST Hit für die Annotation	Organismus	E-Wert				
C1 Stoffwechsel							
<i>acsD</i>	Kohlenmonoxid Dehydrogenase δ -UE ^d	Corrinoid [Fe-S] Proteine, kleine UE ^d	<i>Clostridium thermoaceticum</i>	$8e^{-71}$	-	-	+
<i>acsC</i>	Kohlenmonoxid Dehydrogenase γ -UE ^d	Corrinoid [Fe-S] Protein, große UE ^d	<i>Clostridium thermoaceticum</i>	$1e^{-99}$	-	-	+
<i>coosA</i>	Kohlenmonoxid Dehydrogenase α -UE ^d	Kohlenmonoxid Dehydrogenase, α -UE ^d	<i>Clostridium thermoaceticum</i>	$1e^{-162}$	-	-	+
<i>coosB</i>	Kohlenmonoxid Dehydrogenase β -UE ^d	Kohlenmonoxid Dehydrogenase, katalytische UE ^d	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	$1e^{-175}$	-	-	+
<i>coos1</i>	Kohlenmonoxid Dehydrogenase	Kohlenmonoxid Dehydrogenase	<i>Methanosarcina mazei</i>	0.0	-	+	+
<i>coos2</i>	Kohlenmonoxid Dehydrogenase	Kohlenmonoxid Dehydrogenase	<i>Methanosarcina mazei</i>	$1e^{-153}$	-	-	-
<i>metF</i>	Methylenltetrahydrofolat Reduktase	Methylenltetrahydrofolat Reduktase	<i>Aquifex aeolicus</i>	$8e^{-51}$	-	-	+
<i>fold</i>	Methylenltetrahydrofolat Dehydrogenase	Methylenltetrahydrofolat Dehydrogenase	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	$2e^{-57}$	-	-	+
<i>methfD</i>	Formiat Tetrahydrofolat Ligase	Formiat Tetrahydrofolat Ligase	<i>Homo sapiens</i>	$1e^{-251}$	-	-	+
<i>acsF</i>	CODH Reifungsfaktor	CODH Reifungsfaktor	<i>Clostridium thermoaceticum</i>	$2e^{-54}$	-	+	+
<i>acsE</i>	Methyltransferase	Methyltetrahydrofolat Corrinoid [Fe-S] Protein, Methyltransferase	<i>Clostridium thermoaceticum</i>	$1e^{-32}$	-	-	+

Tabelle 4.4 (Fortsetzung)

Gen	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> ^a			<i>Dt.</i> <i>psychrophila</i> ^b	<i>Dv.</i> <i>vulgaris</i> ^b	<i>A.</i> <i>fulgidus</i> ^b	
	BLAST Hit für die Annotation	Organismus	E-Wert				
Sauerstoff Entgiftung							
<i>rbr</i>	Rubrerythrin	Rubrerythrin	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	7e ⁻⁷³	+	+	+
<i>sod</i>	Superoxid Dismutase	-	-	-	+	+	-
<i>rbo</i>	Rubredoxin	Rubredoxin	<i>Thermogata maritima</i>	5e ⁻¹⁶	+	+	+
<i>cat</i>	Katalase	-	-	-	+	+	-
<i>sor</i>	Desulfoferrodoxin	Desulfoferrodoxin	<i>Desulfovibrio baarsii</i>	2e ⁻⁴⁰	+	+	-
NADH abhängige Oxidoreduktasen							
<i>ndh1</i>	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	-	-	+	-	-
<i>ndh2</i>	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	-	-	+	-	-
<i>ndh3</i>	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	-	-	+	-	-
<i>ndh4</i>	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	-	-	+	-	-
<i>ndh5</i>	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	-	-	+	-	-
<i>ndh6</i>	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	-	-	+	-	-
<i>ndh7</i>	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	-	-	+	-	-
<i>ndh8</i>	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	-	-	+	-	-
<i>ndh9</i>	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	-	-	+	-	-
<i>ndh10</i>	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	NADH Ubiquinon Oxidoreduktase	-	-	+	-	-

Tabelle 4.4 (Fortsetzung)

Gen	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> ^a			<i>Dt. psychrophila</i> ^b	<i>Dv. vulgaris</i> ^b	<i>A. fulgidus</i> ^b	
	BLAST Hit für die Annotation	Organismus	E-Wert				
NADH abhängige Oxidoreduktasen							
<i>rnfA</i>	Elektronen Transport Komplex	Elektronen Transport Komplex, RnfA	<i>Photorhabdus luminescens</i>	1e ⁻⁵²	-	+	-
<i>rnfC</i>	Elektronen Transport Komplex	Elektronen Transport Komplex, RnfC	<i>Pasteurella multocida</i>	1e ⁻²¹	-	+	-
<i>rnfD</i>	Elektronen Transport Komplex	Elektronen Transport Komplex, RnfD	<i>Photorhabdus luminescens</i>	4e ⁻⁵¹	-	+	-
<i>rnfE</i>	Elektronen Transport Komplex	Elektronen Transport Komplex, RnfE	<i>Clostridium tetanii</i>	5e ⁻³⁴	-	+	-
<i>rnfG</i>	Elektronen Transport Komplex	Elektronen Transport Komplex, RnfG	<i>Photorhabdus luminescens</i>	5e ⁻¹⁵	-	+	-
Energiekonservierung							
<i>atpB</i>	ATP Synthase Komplex	F0F1-type ATP synthase	<i>Helicobacter hepaticus</i>	2e ⁻²⁹	+	+	+
<i>atpC</i>	ATP Synthase Komplex	F1F0-ATPase α -UE ^d	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	0.0	+	+	+
<i>atpD</i>	ATP Synthase Komplex	Proton ATPase β -UE ^d	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	0.0	+	+	+
<i>atpF</i>	ATP Synthase Komplex	ATP synthase B chain	<i>Synechocystid spec.</i>	6e ⁻¹¹	+	+	+
<i>atpG</i>	ATP Synthase Komplex	ATP synthase F1, γ -UE ^d	<i>Chlorobium tepidum</i>	2e ⁵¹	+	+	+
<i>atpH</i>	ATP Synthase Komplex	ATP synthase delta chain	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1e ⁻²²	+	+	+

Tabelle 4.4 (Fortsetzung)

Gen	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> ^a			<i>Dt.</i> <i>psychrophila</i> ^b	<i>Dv.</i> <i>vulgaris</i> ^b	<i>A.</i> <i>fulgidus</i> ^b	
	BLAST Hit für die Annotation	Organismus	E-Wert				
Cytochrome							
<i>c</i> ₃ (TpII)	Tetraäm Cytochrom <i>c</i> ₃ (II) ^c	Acidic cytochrom <i>c</i> ₃ precursor	<i>Desulfovibrio africanus</i>	3e ⁻²⁰	-	+	-
<i>c</i> ₃ (TpI)	Tetraäm Cytochrom <i>c</i> ₃ (I) ^c	Tetraäm Cytochrom <i>c</i> ₃	<i>Desulfovibrio gigas</i>	2e ⁻¹⁵	-	+	-
<i>c</i> ₅₅₄	Cytochrom <i>c</i> ₅₅₄	Cytochrom <i>c</i> ₅₅₄	<i>Rhodopirellula baltica</i>	9e ⁻¹⁴	-	-	-
<i>resC</i>	<i>c</i> ₃ Biogenese Protein	Cytochrome <i>c</i> -Type maturation Protein	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	1e ⁻³⁰	-	+	-
<i>hmcA</i>	Hmc-Komplex A (Cytochrom)	-	-	-	-	+	-
<i>hmcB</i>	Hmc-Komplex B	-	-	-	-	+	-
<i>hmcC</i>	Hmc-Komplex C	-	-	-	-	+	-
<i>hmcD</i>	Hmc-Komplex D	-	-	-	-	+	-
<i>hmcE</i>	Hmc-Komplex E	Hmc-Komplex E	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	4e ⁻⁷⁸	-	+	-
<i>hmcF</i>	Hmc-Komplex F	Hmc-Komplex F	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	4e ⁻³⁶	-	+	-
Metabolismus							
<i>adh</i>	Alkohol-Dehydrogenase (kurzkettig)	Oxidoreduktase, kurzkettige Dehydrogenase	<i>Pseudomonas putida</i>	1e ⁻⁷⁵	-	-	-
<i>adh</i>	Alkohol-Dehydrogenase (Zink)	Alkohol-Dehydrogenase	<i>Bacillus cereus</i>	1e ⁻¹⁰⁰	-	-	+
<i>adh</i>	Alkohol-Dehydrogenase (Eisen)	Alkohol-Dehydrogenase, Eisen abhängig	<i>Vibrio vulnificus</i>	1e ⁻¹²⁶	+	+	+
<i>ldh</i>	Laktat-Dehydrogenase	L-Laktat-Dehydrogenase	<i>Leptospira interrogans</i>	2e ⁻⁶²	+	+	+

Tabelle 4.4 (Fortsetzung)

Gen	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> ^a			<i>Dt. psychrophila</i> ^b	<i>Dv. vulgaris</i> ^b	<i>A. fulgidus</i> ^b	
	BLAST Hit für die Annotation	Organismus	E-Wert				
Metabolismus							
<i>porA</i>	Pyruvat: Ferredoxin Oxidoreduktase	Pyruvat: Ferredoxin Oxidoreduktase und verwandte Enzyme	<i>Thermoanaerobacter tencongensis</i>	2e ⁻⁵⁶	+	+	+
<i>proB</i>	Pyruvat: Ferredoxin Oxidoreduktase	-	-	-	+	+	+
<i>por</i>	Pyruvat: Ferredoxin Oxidoreduktase	Pyruvat: Ferredoxin Oxidoreduktase	<i>Desulfovibrio africanus</i>	0.0	+	+	-
<i>cisY</i>	Citrat-Synthase	Citrat-Synthase	<i>Leptospira interrogans</i>	1e ⁻¹³⁹	+	-	+
<i>accn</i>	Aconitase	long hypothetical Aconitase hydratase	<i>Aeropyrum pernix</i>	0.0	+	-	+
<i>idh</i>	Isocitrat-Dehydrogenase	Isocitrat-Dehydrogenase	<i>Bacillus israelii</i>	1e ⁻¹³²	+	+	+
<i>korA</i>	2-Oxoglutarat-Synthase	-	-	-	(+)	-	+
<i>korB</i>	2-Oxoglutarat-Synthase	2-Oxoglutarat-Synthase, β-UE ^d	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2e ⁻³⁸	(+)	-	+
<i>korC</i>	2-Oxoglutarat-Synthase	2-Oxoglutarat-Synthase γ-UE ^d	<i>Methanococcus jannaschii</i>	3e ⁻³⁰	(+)	-	+
<i>sucB</i>	Succinat-CoA-Ligase	Succinat-CoA-Ligase, α-UE ^d	<i>Bacillus subtilis</i>	2e ⁻⁸⁵	+	+	+
<i>sucC</i>	Succinat-CoA-Ligase	Succinat-CoA-Ligase, β-UE ^d	<i>Bacillus anthracis</i>	1e ⁻¹¹⁷	+	+	+
<i>sdhA</i>	Succinat-Dehydrogenase	Succinat-Dehydrogenase	-	-	+	-	+
<i>sdhB</i>	Succinat-Dehydrogenase	Succinat-Dehydrogenase	-	-	+	-	+
<i>fum</i>	Fumerase	Fumarat Hydratase, aerob	<i>Escherichia coli</i>	0.0	+	+	+

Tabelle 4.4 (Fortsetzung)

Gen	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> ^a			<i>Dt. psychrophila</i> ^b	<i>Dv. vulgaris</i> ^b	<i>A. fulgidus</i> ^b	
	BLAST Hit für die Annotation	Organismus	E-Wert				
Metabolismus							
<i>mdh</i>	Malat-Dehydrogenase	-	-	-	+	-	+
<i>mae</i>	Malatenzym	NAD Malatenzym	<i>Thermus thermophilus</i>	1e ⁻¹¹⁰	+	-	+
<i>mut</i>	Methylmalonyl-CoA-Mutase	Methylmalonyl-CoA-Mutase, β-UE ^d	<i>Deinococcus radiodurans</i>	0.0	-	-	+
<i>ppcB</i>	Propionyl-CoA-Carboxylase	Propionyl-CoA-Carboxylase	<i>Methanosarcina mazei</i>	1e ⁻¹³⁶	-	-	+
<i>pfla</i>	Pyruvat-Formiat-Lyase Aktivierung	Pyruvat-Formiat-Lyase Aktivierung	<i>Escherichia coli</i>	2e ⁻⁶⁵	+	+	+
<i>pfl</i>	Pyruvat-Formiat-Lyase	Pyruvat-Formiat-Lyase	<i>Desulfotalea psychrophila</i>	1e ⁻¹⁰⁷	+	-	+
<i>frdA</i>	Fumarat-Reduktase	Fumarat-Reduktase , Flavoprotein	<i>Shewanella oneidensis</i>	7e ⁻⁹⁶	+	+	-
<i>frdB</i>	Fumarat-Reduktase	Fumarat-Reduktase, [Fe-S]-UE ^d	<i>Shewanella oneidensis</i>	0.0	+	+	-
<i>frdC</i>	Fumarat-Reduktase	Fumarat-Reduktase, Cytochrom B UE ^d	<i>Shewanella oneidensis</i>	1e ⁻⁶⁰	+	+	-
<i>oadA</i>	Oxalacetat-Decarboxylase	Oxalacetat-Decarboxylase α-UE ^d	<i>Vibrio Cholerae</i>	5e ⁻⁷	+	-	+
<i>oadB</i>	Oxalacetat-Decarboxylase	Oxalacetat-Decarboxylase β-UE ^d	<i>Aquifex aeolicus</i>	3e ⁻⁹¹	+	-	+

a) Genidentifikation aus den vorläufigen Genomdaten

b) Genidentifikation aus veröffentlichten Genomdaten

c) bei *D. autotrophicum* wurde bei mindestens einer Untereinheit ein Signalpeptid bzw. Twin-Arginin Motiv identifiziert

d) UE: Untereinheit

4.7 Cytochromanalyse – Vergleich zwischen *Desulfobacterium autotrophicum* und *Desulfotalea psychrophila*

Im Genom von *Dt. psychrophila* konnten keinerlei Gene für *c*-Typ Cytochrome identifiziert werden (Rabus et al. 2004). Um diesen ungewöhnlichen Befund zu bestätigen, wurden UV/VIS Spektren zellfreier Extrakte von *Dt. psychrophila* aufgenommen. Für *Dt. psychrophila* konnte die Abwesenheit von *c*-Typ Cytochromen bestätigt werden, während für *Db. autotrophicum* und *Dv. vulgaris* deren typische Absorptionsmaxima nachgewiesen werden konnten. Das Fehlen von *c*-Typ Cytochromen ist ein ungewöhnlicher Befund, da ihnen, wie zuvor beschrieben, eine wichtige Funktion beim Elektronentransport zukommt. Es gibt allerdings noch eine Reihe weiterer Moleküle, die in Frage kommen, um diese Funktion zu übernehmen: so z.B. Ferredoxine oder Flavodoxine. Abbildung 4.7 zeigt die Redoxpotentiale dieser verschiedenen Elektronencarriermoleküle. Auch hier wird deutlich, dass sowohl Ferredoxine als auch Flavodoxine über Redoxpotentiale verfügen, die denen der verschiedenen Häm-Gruppen der Cytochrome ähnlich sind. Die Werte in der Abbildung geben eine mögliche Bandbreite der Redoxpotentiale an. Welche Werte tatsächlich zutreffen hängt stark vom einzelnen Protein ab.

Im Genom von *Dt. psychrophila* konnten Gene für Ferredoxine und Flavodoxine für Ferredoxine und Flavodoxine gefunden werden. Es konnte auch ein ORF identifiziert werden, der für ein Flavodoxin kodiert, das über ein Twin-Arginin-Motiv (DP0917) verfügt und somit im Periplasma lokalisiert sein könnte. Dieses Protein kommt somit als Elektronencarrier zwischen löslichen Hydrogenasen im Periplasma und einem Transmembrankomplex in Frage. Um diese These zu bestätigen sind allerdings weitere Untersuchungen nötig, z.B. ein experimenteller Nachweis der Interaktion zwischen dem Ferredoxin und einer Hydrogenase. Cytochrome als Interaktionspartner für Hydrogenasen sind bei sulfatreduzierenden Bakterien weit verbreitet und in vielen Fällen konnte die Interaktion experimentell bestätigt werden. Bei sulfatreduzierenden Archaeobakterien konnten bisher jedoch lediglich Ferredoxine und Menaquinone als Elektronencarriermoleküle gefunden werden (Rabus et al. 1999). Auch konnte für Archaeobakterien bereits nachgewiesen werden, dass Ferredoxine als Elektronencarrier mit Hydrogenasen interagieren (Meuer et al. 2002; Terlesky und Ferry 1988).

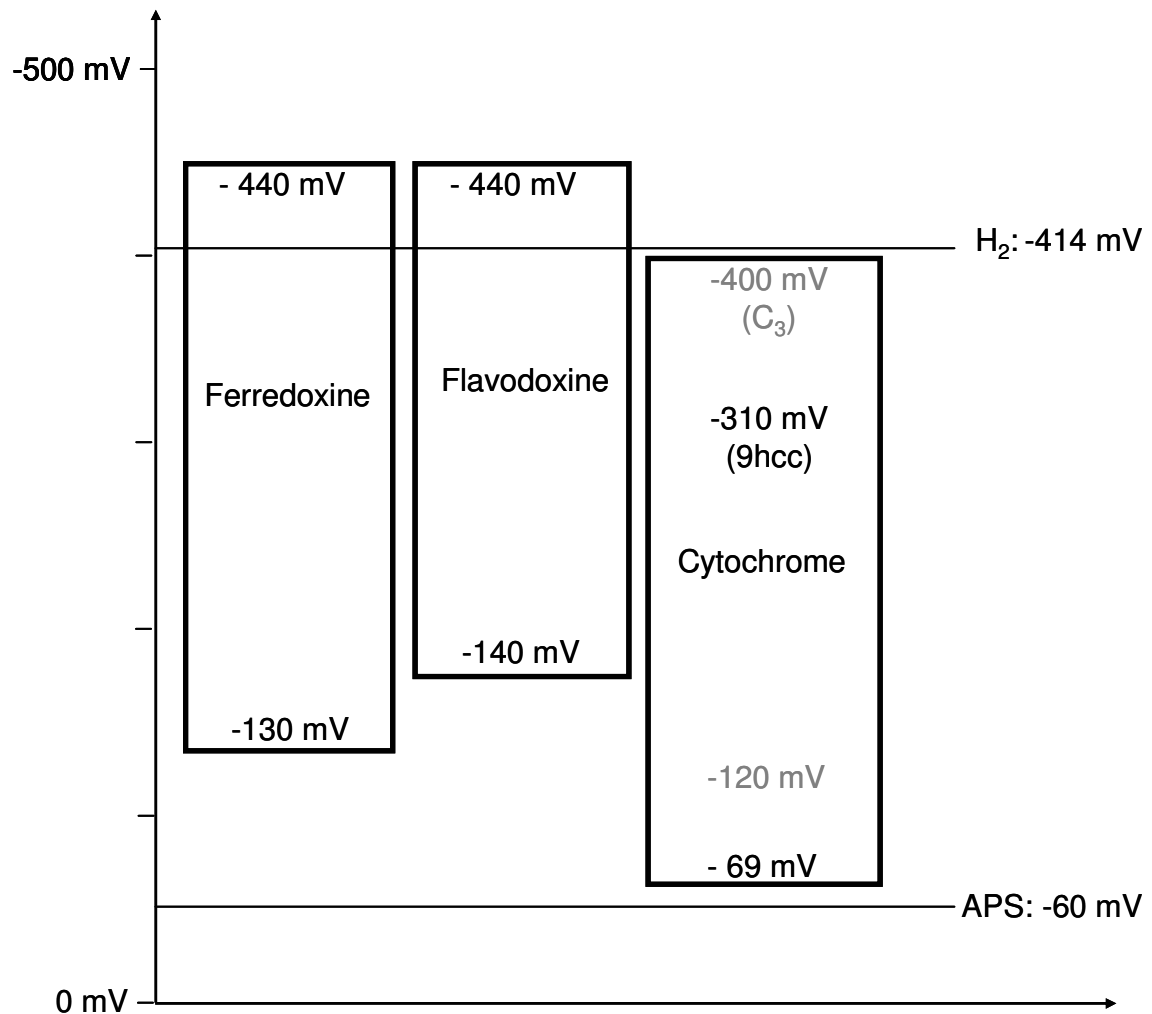


Abbildung 4.7 Redoxpotentiale verschiedener Elektronencarriermoleküle

Bei *Db. autotrophicum* konnte die Existenz von Cytochromen, sowohl experimentell als auch auf genetischer Ebene bestätigt werden. Phylogenetisch gehören beide Organismen zu den Deltaproteobacteria, *Dt. psychrophila* fällt jedoch phylogenetisch in ein anderes Cluster (siehe Kapitel 1.2.2, Abbildung 1.4). Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang und es haben sich im Verlauf der Evolution andere Moleküle als bevorzugte Elektronencarrier etabliert.

5 LITERATUR

- Albright, L. M., E. Huala, and F. M. Ausubel.** 1989. Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. *Annual Reviews of Genetics* **23**:311-336.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**:403-410.
- Antelmann, H., S. Engelmann, R. Schmid and M. Hecker.** 1996. General and oxidative stress response in *Bacillus subtilis*: Cloning, expression and mutation of the alkyl hydroperoxide reductase operon. *Journal of Bacteriology* **178**:6571-6578.
- Berger, F., N. Morellet, F. Menu, and P. Potier.** 1996. Cold shock and cold acclimation proteins in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55. *Journal of Bacteriology* **178**:2999-3007.
- Berks, B. C.** 1996. A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* **22**:393-404.
- Birch, A., A. Leiser, and J. A. Robinson.** 1993. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding methylmalonyl-Coenzyme A mutase from *Streptomyces cinnamonensis*. *Journal of Bacteriology* **175**:3511-3519.
- Bott, M., K. Pfister, P. Burda, O. Kalbermatter, G. Woehlke, and P. Dimroth.** 1997. Methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Propionum modestum*: Cloning and sequencing of the structural genes and purification of the enzyme complex. *European Journal of Biochemistry* **250**:590-599.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-54.
- Brandis-Heep, A., N. A. Gebhardt, R. K. Thauer, F. Widdel, and N. Pfenning.** 1983. Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfobacter postgatei*. *Archives of Microbiology* **136**:221-229.
- Bryant, M. P.** 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition* **25**:1324-1328.
- Brysch, K., C. Schneider, G. Fuchs, and F. Widdel.** 1987. Lithoautotrophic growth of sulfate-reducing bacteria, and description of *Desulfobacterium autotrophicum* gen. nov., sp. nov. *Archives of Microbiology* **148**:264-274.

- Bustin, S. A.** 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**:169-193.
- Bustin, S. A.** 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* **29**:23-39.
- Cabiscol, E., J. Aguilar, and J. Ros.** 1994. Metal-catalyzed oxidation of Fe²⁺ dehydrogenases. *The Journal of Biological Chemistry* **269**:6592-6597.
- Castro, H. F., N. H. Williams, and A. Ogram.** 2000. Phylogeny of sulfate reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **31**:1-9.
- Charles, T. C., and P. Aneja.** 1999. Methylmalonyl-CoA mutase encoding gene of *Sinorhizobium meliloti*. *Gene* **226**:121-127.
- Cline, J. D.** 1969. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology Oceanography* **14**:454-458.
- Colucci, M. S., and W. E. Innis.** 1996. Ethylene glycol utilization, cold and ethylene glycol shock and acclimation proteins in a psychrotrophic bacterium. *Current Microbiology* **32**:179-182.
- Conway, T., G. W. Sewell, Y. A. Osman, and L. O. Ingram.** 1987. Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology* **169**:2591-2597.
- Costa Seaver, L., and J. A. Imlay.** 2001. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **183**:7182-7189.
- Czjzek, M., L. ElAntak, V. Zamboni, X. Morelli, A. Dolla, F. Guerlesquin, and M. Bruschi.** 2002. The crystal structure of the hexadeca-heme cytochrome Hmc and a structural model of its complex with cytochrome C3. *Structure* **10**:1677-1686.
- Daniel, R., R. Boenigk, and G. Gottschalk.** 1995. Purification of 1,3-propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing and overexpression of the corresponding gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **177**:2151-2156.
- de Vries, G. E., N. Harms, K. Maurer, A. Papendrecht and A.H. Stouthamer.** 1988. Physiological regulation of *Paracoccus denitrificans* methanol dehydrogenase synthesis and activity. *Journal of Bacteriology* **170**:3731-3737.
- Doherty, N. S., B. H. Littman, K. Reilly, A. C. Swindell, J. M. Buss and N. L. Anderson.** 1998. Analysis of changes in acute-phase plasma proteins in acute inflammatory response and in rheumatoid arthritis using two dimensional gel

- electrophoresis. *Electrophoresis* **19**:355-363.
- Doukov T. I., T. M. Iverson, J. Seravalli, S. Ragsdale and C. L. Drennan.** 2002. A Ni-Fe-Cu center in a bifunctional carbon monoxide dehydrogenase / acetyl CoA synthase. *Science* **298**:567-572.
- Drennan, C. L., J. Heo, M. Sintchak, E. Schreiter, and P. W. Ludden.** 2001. Life on carbon monoxide: X-ray structure of *Rhodospirillum rubrum* Ni-Fe-S carbon monoxide dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:11973-11978.
- Eggen, R. I. L., R. van Kranenburg, A. J. M. Vriesevan, A. C. M. Geerling, M. F. J. M. Verhagen, W. R. Hagen, and W. M. de Vos.** 1996. Carbon monoxide dehydrogenase from *Methanosarcina frisia* Gö1. *The Journal of Biological Chemistry* **271**:14256-14263.
- ElAntak, L., X. Morelli, O. Bornet, E. C. Hatchikian, M. Czjzek, A. Dolla, and F. Guerlesquin.** 2003. The cytochrome c₃-[Fe]-hydrogenase electron-transfer complex: structural model by NMR restrained docking. *FEBS Letters* **548**:1-4.
- Frangeul, L., K. E. Nelson, C. Buchrieser, A. Danchin, P. Glaser, and F. Kunst.** 1999. Cloning an assembly strategies in microbial genome projects. *Microbiology* **145**:2625-2634.
- Gade, D., J. Thiermann, D. Markowsky, and R. Rabus.** 2003. Evaluation of Two-Dimensional Difference Gel Electrophoresis for protein profiling. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **5**:240-251.
- Gerday, C., M. Aittaleb, J. L. Arpigny, E. Baise, J.-P. Chessa, G. Garsoux, I. Petrescu, and G. Feller.** 1997. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochimica et Biophysica Acta* **1342**:119-131.
- Ginzinger, D. G.** 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* **30**:503-512.
- Graumann, P., and M. A. Marahiel.** 1996. Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Archives of Microbiology* **166**:293-300.
- Hansen, T. A.** 1994. Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. *Antonie van Leeuwenhoek* **66**:165-185.
- Harms, N., W. N. M. Reijnders, H. Anazawa, C. J. N. M. van der Palen, R. J. M. van Spanning, L. F. Oltmann, and A. H. Stouthammer.** 1993. Identification of a two-component regulatory system controlling methanol dehydrogenase synthesis in *Paracoccus denitrificans*. *Molecular Microbiology* **8**:457-470.

- Harms, N., W. N. M. Reijnders, S. Koning and R. J. M van Spanning.**2001. Two-component system that regulates methanol and formaldehyde oxidation in *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Bacteriology* **183**:664-670.
- Haveman, S. A., V. Brunelle, J. K. Voordouw, G. Voordouw, J. F. Heidelberg, and R. Rabus.** 2003. Gene expression analysis of energy metabolism mutants of *Desulfovibrio vulgaris* indicates an important role for alcohol dehydrogenases. *Journal of Bacteriology* **185**:4345-4353.
- Heidelberg, J. F., R. Seshadri, S. A. Haveman, C. L. Hemme, I. T. Paulson, J. F. Kolonay, J. A. Eisen, N. Ward, B. Methe, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. T. Deboy, R. J. Dodson, A. S. Durkin, R. Madapu, W. C. Nelson, S. A. Sullivan, D. Fouts, D. H. Haft, J. Selengut, J. D. Peterson, T. M. Davidsen, N. Zafar, L. Zhou, R. Diana, G. Dimitrov, M. Hance, K. Tran, H. Khouri, J. Gill, T. R. Utterback, T. V. Feldbluym, J. D. Wall, G. Voordouw, and C. M. Fraser.** 2004. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Nature Biotechnology* **22**:554-559.
- Hensgens, C. M. H., J. Vonck, J. van Beeumen, E. F. J. van Bruggen, and T. A. Hansen.** 1993. Purification and characterization of an oxygen-labile, NAD-dependent alcohol dehydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Journal of Bacteriology* **175**:2859-2863.
- Hensgens, C. M. H., M. Jansen, H. E. Nienhuis-Kuiper, E. J. Boekema, J. F. L. Van Breemen, and T. A. Hansen.** 1995. Purification and characterization of an alcohol dehydrogenase from 1,2-propanediol-grown *Desulfovibrio* strain HDv. *Archives of Microbiology* **164**:265-270.
- Heuskoven J. and R. Dernick.** 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhasSystem Development Unit. *Electrophoresis* **9**:28-32.
- Hugenholtz, P., B. M. Goebel, and N. R. Pace.** 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* **180**:4765-4774.
- Jang H. H., K. O. Lee, Y. H. Chi, B. G. Jung, S. K. Park, J. H. Park, J. R. Lee, S. S. Lee, J. C. Moon, J. W. Yun, Y. O. Choi, W. Y. Kim, J. S. Kang, G.-W. Cheong, D.-J. Yun, S. G. Rhee, M. J. Cho and S. Y. Lee.** 2004. Two enzymes in one: Two yeast peroxiredoxins display oxidative stress dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* **117**:625-635.
- Jørgensen, B.B.** 1982. Mineralization of organic matter in the sea-bed – the role of

- sulphate reduction. *Nature* **296**:643-645.
- Jones C. W. and R. K. Poole.** 1985. The analysis of cytochromes. *Methods in Microbiology*. **18**:285-328.
- Jouanneau, Y., H.-S. Jeong, N. Hugo, C. Meyer, and J. C. Willison.** 1998. Overexpression in *Escherichia coli* of the *rnf* genes from *Rhodobacter capsulatus* Characterization of two membrane bound iron-sulfur proteins. *European Journal of Biochemistry* **251**.
- Kalnenieks, U., N. Galinina, M. M. Toma, and U. Marjutina.** 2002. Ethanol cycle in an ethanologenic bacterium. *FEBS Letters* **522**:6-8.
- Kamphuis, W., A. Schneemann, L.M van Beek, A.B Smit, P.F.J. Hoyng, E. Koya.** 2001. Prostanoid receptor gene expression profile in human trabecular meshwork: a quantitative real-time PCR approach. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**:3209-3215.
- Karkhoff-Schweizer, R.-A. R., M. Bruschi, and G. Voordouw.** 1993. Expression of the gamma subunit gene of desulfoviridin-type dissimilatory sulfite reductase and if the alpha- and beta-subunit genes is not coordinately regulated. *European Journal of Biochemistry* **211**:501-507.
- Keon, R. G., and G. Voordouw.** 1996. Identification of the HmcF and Topology of the HmcB subunit of the Hmc complex of *Desulfovibrio vulgaris*. *Anaerobe* **2**:231-238.
- Keon, R. G., R. Fu, and G. Voordouw.** 1997. Deletion of two downstream genes alters expression of the *hmc* operon of *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* Hildenborough. *Archives of Microbiology* **167**:376-383.
- Klenk, H. P., R. A. Clayton, J. F. Tomb, O. White, K. E. Nelson, K. A. Ketchum, R. J. Dodson, M. Gwinn, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. R. Delwood, A. R. Kerlavage, D. E. Graham, N. C. Kyrpides, R. D. Fleischmann, J. Quackenbush, N. H. Lee, G. G. Sutton, S. Gil, E. F. Kirkness, B. A. Dougherty, K. McKenney, M. D. Adams, B. Loftus, S. Peterson, C. I. Reich, L. K. McNeil, J. H. Badger, A. Glodek, L. Zhou, R. Overbeek, J. D. Gocayne, J. F. Weidman, L. McDonald, T. Utterback, M. D. Cotton, T. Spriggs, P. Artiach, B. P. Kaine, S. M. Sykes, P. W. Sadow, K. P. D'Andrea, C. Bowman, C. Fujii, S. A. Garland, T. M. Mason, G. J. Olsen, C. M. Fraser, H. O. Smith, C. R. Woese, and J. C. Venter.** 1997. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**:364-370.
- Knoblauch, C., K. Sahm, and B. B. Jørgensen.** 1999. Psychrophilic sulfate-reducing

- bacteria isolated from permanently cold Arctic marine sediments: description of *Desulfofrigus oceanense* gen. nov., sp. nov., *Desulfofrigus fragile* sp. nov., *Desulfofaba gelida* gen. nov., sp. nov., *Desulfotalea psychrophila* gen. nov., sp. nov., and *Desulfotalea arctica* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**:1631-1643.
- Könneke, M., and F. Widdel.** 2003. Effect of growth temperature on cellular fatty acids in sulphate-reducing bacteria. *Environmental Microbiology* **5**:1064-1070.
- Kremer, D. R., H. E. Nienhuis-Kuiper, and T. A. Hansen.** 1988. Ethanol dissimilation in *Desulfovibrio*. *Archives of Microbiology* **150**:552-557.
- Kumagai, H., T. Fujiwara, H. Matsubara, and K. Saeki.** 1997. Membrane localization, topology, and mutual stabilization of the *rnfABC* Gene products from *Rhodobacter capsulatus* and implications for a new family of energy-coupling NADH Oxidoreductases. *Biochemistry* **36**:5509-5521.
- Länge, S., R. Scholtz and G. Fuchs.** 1989. Oxidative and reductive acetyl CoA / carbon monoxide dehydrogenase pathway in *Desulfobacterium autotrophicum*. *Archives of Microbiology*. **151**:77-83.
- Larsen, O., T. Lien, and N.-K. Birkeland.** 2000. Characterization of the desulforubidin operons from *Desulfobacter vibrioformis* and *Desulfobulbus rhabdoformis*. *FEMS Microbiology Letters* **186**:41-46.
- Leblanc, L., C. Lebeouf, F. Leroi, A. Hartke, and Y. Auffray.** 2003. Comparison between NaCl tolerance response and acclimation to cold temperature in *Shewanella putrefaciens*. *Current Microbiology* **46**:157-162.
- Lindahl, P. A.** 2002. The Ni-containing carbon monoxide dehydrogenase family: light at the end of the tunnel? *Biochemistry* **41**:2097-2105.
- Link, A.J., K. Robinson and G.M. Church.** 1997. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis* **18**:1259-1313.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* **25**:402-408.
- Llobet-Brossa, E., R. Rabus, M. E. Böttcher, M. Könneke, N. Finke, A. Schramm, R. L. Meyer, S. Grötzschel, R. Rossello-Mora, and R. Amann.** 2002. Community structure and activity of sulfate -reducing bacteria in an intertidal surface sediment: a multi-method approach. *Aquatic Microbial Ecology* **29**:211-226.
- Lopez M. F., K. Berggren, E. Chernokalskaya, A. Lazarev, M. Robinson, and W. F.**

- Patton.** 2000. A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by mass profiling. *Electrophoresis* **21**:3673-3683.
- Lu, W.-P., I. Schiau, J. R. Cunningham, and S. W. Ragsdale.** 1993. Sequence and expression of the gene encoding the corrinoid iron / sulfur protein from *Clostridium thermoaceticum* and reconstitution of the protein to full activity. *Journal of Biological Chemistry* **268**:5605-5614.
- Mancia, F., G. A. Smith, and P. R. Evans.** 1999. Crystal structure of substrate complexes of methylmalonyl-CoA mutase. *Biochemistry* **38**:7999-8005.
- Mander, G. J., E. C. Duin, D. Linder, K. O. Stetter, and R. Hedderich.** 2002. Purification and characterization of membrane-bound enzyme complex from the sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* related to heterodisulfide reductase from methanogenic archaea. *European Journal of Biochemistry* **269**:1895-1904.
- Margo, V., L. Pieulle, N. Forget, B. Guigliarelli, Y. Petillot, and E. C. Hatchikian.** 1997. Further characterization of the two tetraheme cytochromes c3 from *Desulfovibrio africanus*: nucleotide sequences, EPR spectroscopy and biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1342**:149-163.
- Matias, P. M., R. Coelho, I. A. C. Pereira, A. V. Coelho, A. W. Thompson, L. C. Sieker, J. Le Gall, and M. A. Carrondo.** 1999a. The primary and three-dimensional structures of a nine-haem cytochrome c from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 reveal a new member of the Hmc family. *Structure* **7**:119-130.
- Matias, P. M., L. M. Saraiva, C. M. Soares, A. V. Coelho, J. Le Gall, and M. A. Carrondo.** 1999b. Nine-heme cytochrome c from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC27774: primary sequence determination, crystallographic refinement at 1.8 and modelling studies of its interaction with the tetraheme cytochrome c3. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **4**:478-494.
- Meuer, J., H. C. Kuettnner, J. K. Zhang, R. Hedderich, and W. W. Metcalf.** 2002. Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in Methanogenesis an carbon fixation. *PNAS* **99**:5632-5637.
- Meyer, F., A. Goesmann, A. C. McHardy, D. Bartels, T. Bekel, J. Clausen, J. Kalinowski, B. Linke, O. Rupp, R. Giegerich, and A. Pühler.** 2003. GenDB - an

- open source gnome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Research* **31**:2187-2195.
- Miyamoto, E., F. Watanabe, T. C. Charles, R. Yamaji, H. Inui, and Y. Nakano.** 2003. Purification and characterization of homodimeric methylmalonyl-CoA mutase from *Sinorhizobium meliloti*. *Archives of Microbiology* **180**:152-154.
- Mizuno, N., G. Voordouw, K. Miki, A. Sarai, and Y. Higuchi.** 2003. Crystal Structure of Dissimilatory Sulfite Reductase D (DsrD) Protein--Possible Interaction with B- and Z-DNA by Its Winged-Helix Motif. *Structure* **11**:1133-1140.
- Morton, T.A., J.A. Runquist, S.W. Ragsdale, T. Shanmugasundaram, H.G. Wood, und L.G. Ljungdahl.** 1991. The primary structure of the subunits of carbon monoxide dehydrogenase / acetyl-CoA synthase from *Clostridium thermoaceticum*. *The Journal of Biological Chemistry* **266**:23824-23828.
- Nedwell D.B.** 1999. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrate limits growth at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology*. **30**:101-111.
- Nelson, K. E., I. T. Paulson, J. F. Heidelberg, and C. M. Fraser.** 2000. Status of genome projects for nonpathogenic bacteria and archaea. *Nature Biotechnology* **18**:1049-1054.
- Neretin, L. N., A. Schippers, A. Pernthaler, K. Hamann, R. Amann, and B. B. Jorgensen.** 2003. Quantification of dissimilatory (bi)sulphite reductase gene expression in *Desulfobacterium autotrophicum* using real-time RT-PCR. *Environmental Microbiology* **5**:660-671.
- Odom, J. M., and H. D. Peck.** 1984. Hydrogenase, electron-transfer proteins and energy coupling in the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio*. *Annual Review of Microbiology* **38**:551-592.
- Panoff, J-M., D. Corroler, B. Thammavongs, and P. Boutibonnes.** 1997. Differentiation between cold shock proteins and cold acclimation proteins in a mesophilic gram-positive bacterium, *Enterococcus faecalis* JH2-2. *Journal of bacteriology* **179**:4451-4454.
- Panoff, J-M., B. Thammavogons, M. Guegen, and P. Boutibonnes.** 1998. Cold stress responses in mesophilic bacteria. *Cryobiology* **36**:75-83.
- Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**:2002-2007.
- Phadtare, S., J. Alsina, and M. Inouye.** 1999. Cold shock response and cold-shock

- proteins. *Current Opinion in Microbiology* **2**:175-180.
- Phorelic, B. J. K., J. K. Voordouw, E. Lojou, A. Dolla, J. Harder, and G. Voordouw.** 2002. Effects of deletion of genes encoding fe-only hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* on hydrogen and lactate metabolism. *Journal of Bacteriology* **184**:679-686.
- Pieulle, L., J. Haladjian, J. Bonicel, and E. C. Hatchikian.** 1996. Biochemical studies of the c-type cytochromes of the sulfate reducer *Desulfovibrio africanus*. Characterization of two tetraheme cytochromes c3 with different specificity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1273**:51-61.
- Pires, R. H., A. I. Lourenco, F. Morais, M. Teixeira, A. V. Xavier, L. M. Saraiva, and I. A. C. Pereira.** 2003. A novel membrane-bound respiratory complex from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Biochimica et Biophysica Acta* **1605**:67-82.
- Poole, R. K.** 1994. Analysis of Cytochromes, p. 311-344. In M. Goodfellow and A. G. O'Donnell (ed.), *Chemical methods in prokaryotic systematics*. Wiley, Chichester.
- Postgate J. R and L. L. Campbell.** 1966. Classification of *Desulfovibrio* species, the nonsporin sulfate-reducing bacteria. *Bacteriological Reviews*.**30**:732-738.
- Pott, A. S., and C. Dahl.** 1998. Sirohaem sulfite reductase and other proteins encoded by genes at the *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiology* **144**:1881-1894.
- Purdy, K. J., D. B. Nedwell, T. M. Embley, and S. Takii.** 2001. Use of 16s rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the distribution of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments. *FEMS Microbiology Ecology* **36**:165-168.
- Purdy, K. J., T. M. Embley, and D. B. Nedwell.** 2002. The distribution and activity of sulphate reducing bacteria in estuarine and coastal marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**:181-187.
- Rabus, R., T. Hansen and F. Widdel.** 1999. Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. *The Prokaryotes – an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E. Heidelberg: Springer Science Online. URL <http://www.prokaryotes.com>
- Rabus, R., V. Brüchert, J. Amann and M. Könneke.** 2002. Physiological response to temperature changes of the marine, sulfate-reducing bacterium *Desulfobacterium autotrophicum*. *FEMS Microbiology Ecology* **40**:409-417.

- Rabus, R., A. Ruepp, T. Frickey, T. Rattei, B. Fartmann, M. Stark, M. Bauer, A. Zibat, T. Lombardot, I. Becker, J. Amann, K. Gellner, H. Teeling, W. D. Leuschner, F.-O. Glöckner, A. N. Lupas, R. Amann and H.-P. Klenk.** 2004. The genome of *Desulfotalea psychrophila*, a sulfate-reducing bacterium from permanently cold arctic sediments. *Environmental Microbiology*.
- Ramakers, C., J. M. Ruijter, R. H. Lekanne Deprez, and A. F. M. Moorman.** 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* **339**:62-66.
- Reid, M. F., and C. A. Fewson.** 1994. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Critical Reviews in Microbiology* **20**:13-56.
- Rellos, P., J. Ma, and R. K. Scopes.** 1997. Alteration of substrate specificity of *Zymomonas mobilis* alcohol dehydrogenase-2 using *in vitro* random mutagenesis. *Protein Expression and Purification* **9**:83-90.
- Ririe, K. M., R. P. Rasmussen, and C. T. Wittwer.** 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **245**:145-260.
- Rodrigues, R., F. M. A. Valente, I. A. C. Pereira, S. Oliveira, and C. Rodrigues-Pousada.** 2003. A novel membrane-bound Ech [NiFe] hydrogenase in *Desulfovibrio gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **306**:366-375.
- Rossi, M., W. B. R. Pollock, M. W. Reij, R. G. Keon, R. Fu, and G. Voordouw.** 1993. The *hmc* operon of *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* Hildenborough encodes a potential transmembrane redox protein complex. *Journal of Bacteriology* **175**:4699-4711.
- Roy, I., and P. F. Leadlay.** 1992. Physical map location of the new *Escherichia coli* gene *sbm*. *Journal of Bacteriology* **174**:5763-5764.
- Rozen, S. and H. Skaltetsky.** 2003. Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers. In S. Krawetz and S. Misener, eds. *Bioinformatics Methods and Protocols in the series Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 2000, pages 365-386. Code available at <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>
- Russel, N. J.** 1990. Cold adaption of microorganisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. **326**:595-611.
- Saraiva, L. M., P. N. daCosta, C. Conte, A. V. Xavier, and J. Le Gall.** 2001. In the facultative sulfate/nitrate reducer *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC27774, the

- nine-heme cytochrome c is part of a membrane-bound redox complex mainly expressed in sulfate-grown cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1520**:63-70.
- Sass, A., H. Rütters, H. Cypionka, and H. Sass.** 2002. *Desulfobulbus mediterraneus* sp. nov, a sulfate-reducing bacterium growing on mono- and disaccharides. *Archives of Microbiology* **177**:468-474.
- Schauder, R., B. Eikmanns and R.K. Thauer.** 1986. Acetate oxidation to CO₂ in anaerobic bacteria not involving reactions of the citric acid cycle. *Archives of microbiology.* **145**:162-172
- Schauder, R., A. Preuß, M. Jetten and G. Fuchs.** 1989. Oxidative and reductive acetyl CoA / carbon monoxid dehydrogenase pathway in *Desulfobacterium autotrophicum*. *Archives of Microbiology* **151**:84-89.
- Schnell, E., F. Bak and N. Pfenning.** 1989. Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzenes by newly isolated sulfate-reducing bacteria and description of *Desulfobacterium anilini*. *Archives of Microbiology* **152**: 556-563.
- Schobert, M., and H. Görisch.** 2001. A soluble two-component regulatory system controls expression of quinoprotein ethanol dehydrogenase (QEDH) but not expression of cytochrome C 550 of the ethanol-oxidation system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **147**:363-372.
- Scholten, J. C. M., P. M. van Bodegom, J. Vogelaar, A. van Ittersum, K. Hordijk, W. Roelofsen, and A. J. M. Stams.** 2002. Effect of sulfate and nitrate on acetate conversion by anaerobic microorganisms in a freshwater sediment. *FEMS Microbiology Ecology* **42**:375-385.
- Scopes, R. K.** 1983. An iron-activated alcohol dehydrogenase. *FEBS* **156**:303-306.
- Self, W. T., A. Hasona, and K. T. Shanmugam.** 2004. Expression and regulation of an silent operon, *hyf*, coding for hydrogenase 4 isoenzyme in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **186**:580-5878.
- Shelver, D., R. L. Kerby, Y. He, and G. P. Roberts.** 1995. Carbon-monoxide induced activation of gene expression in *Rhodospirillum rubrum* requires the product of *coaA*, a member of the cyclic AMP receptor protein family of transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* **177**:2157-2163.
- Skibinski, D. A., P. Golby, Y.-S. Chang, F. Sargent, R. Hoffman, R. Harper, J. R. Guest, M. M. Attwood, and B. C. Berks.** 2002. Regulation of the hydrogenase-4 operon of *Escherichia coli* by the sigma-54 dependent transcriptional activators FhlA and HyfR. *Journal of Bacteriology* **184**:6642-6653.

- Smith, L.** 1978. Bacterial Cytochromes and their spectral characterization, p. 202-212. In S. Fleischer and L. Packer (ed.), *Methods in Enzymology* vol LIII: Biomembranes, vol. LIII. Academic Press, New York, London.
- Sowers, K. R., T. T. Thai, and R. P. Gunsalus.** 1993. Transcriptional regulation of the carbon monoxide dehydrogenase gene (*cdhA*) in *Methanosarcina thermophila*. *The Journal of Biological Chemistry* **268**:23172-23178.
- Springer, A. L., C. J. Morris and M. E. Lidström.** 1997. Molecular analysis of *mxhD* and *mxhM*, a putative sensor-regulator pair required for oxidation of methanol in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology* **143**:1737-1744.
- Steger, J. L., V. Carr, J. D. Ballard, and L. R. Krumholz.** 2002. *Desulfovibrio* sp. genes involved in the respiration of sulfate during metabolism of hydrogen and lactate. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:1932-1937.
- Sterky, F., and J. Lundeberg.** 2000. Sequence analysis of genes and genomes. *Journal of Biotechnology* **76**:1-31.
- Stetter, K. O.** 1988. *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov: a new taxon of extremely thermophilic archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. **10**:172-173
- Stieb, M., and B. Schink.** 1989. Anaerobic degradation of isobutyrate by methanogenic enrichment cultures and by a *Desulfococcus multivorans* strain. *Archives of Microbiology* **151**:126-132.
- Studholme, D., and R. Dixon.** 2003. Domain architectures of sigma 54 dependent transcriptional activators. *Journal of Bacteriology* **185**:1757-1767.
- Terlesky, K. C., and J. G. Ferry.** 1988. Ferredoxin requirement for electron transport from the carbon monoxide hydrogenase complex to a membrane-bound hydrogenase in acetate grown *Methanosarcina thermophila*. *The Journal of Biological Chemistry* **263**:4075-4079.
- Valente, F. M. A., L. M. Saraiva, J. Le Gall, A. V. Xavier, M. Teixeira, and I. A. C. Pereira.** 2001. A membrane bound cytochrome c3: a type II cytochrome c3 from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *ChemBioChem* **2**:895-905.
- Voordouw, G.** 2002. Carbon monoxide cycling by *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Journal of Bacteriology* **184**:5093-5911.
- Widdel, F.** 1988. Microbiology and ecology of sulfate-reducing bacteria. A.J.B Zehnder *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley&Sons. New York. pp 469-585.
- Widdel, F., and F. Bak.** 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. A. Balows, H.P Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer. *The Prokaryotes* **2**

- ed. Springer Verlag. New York. **3**:3352-3378.
- Wieringa, E., J. Overmann, and H. Cypionka.** 2000. Detection of abundant sulfate-reducing bacteria in marine oxic sediment layers by a combined cultivation and molecular approach. *Environmental Microbiology* **2**:417-427.
- Wood, Z. A., E. Schröder, J. R. Harris, and L. B. Poole.** 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *TRENDS in Biochemical Sciences* **28**:32-40.
- Yang, C., Q. Hua, and K. Shimizu.** 2002. Integration of the information from gene expression and metabolic fluxes for the analysis of the regulatory mechanisms in *Synechocystis*. *Applied Microbiology Biotechnology* **58**:813-822.
- Ye, R. W., T. Wang, L. Bedzyk, and K. M. Croker.** 2001. Applications of DNA microarrays in microbial systems. *Journal of Microbiological Methods* **47**:257-272.
- Zeikus, J. G., M. A. Dawson, T. E. Thompson, K. Ingvorsen, and E. C. Hatchikian.** 1983. Microbial ecology of volcanic sulfidogenesis: isolation and characterization of *Thermodesulfobacterium commune* gen. nov. and sp. nov. *Journal of Genetic Microbiology*. **129**:1159-1169.

PUBLIKATIONEN:

Im Rahmen der Doktorarbeit habe ich an folgenden Publikationen mitgewirkt:

- 1. Physiological response to temperature changes of the marine, sulfate-reducing bacterium *Desulfobacterium autotrophicum***
R. Rabus, V. Brüchert, J. Amann and M. Könneke

FEMS Microbiology Ecology (2002) **40**:409-417

- 2. The genome of *Desulfotalea psychrophila*, a sulfate-reducing bacterium from permanently cold arctic sediments**
R. Rabus, A. Ruepp, T. Frickey, T. Rattei, B. Fartmann, M. Stark, M. Bauer, A. Zibat, T. Lombardot, I. Becker, J. Amann, K. Gellner, H. Teeling, W. D. Leuschner, F.-O. Glöckner, A. N. Lupas, R. Amann and H.-P. Klenk

Environmental Microbiology (2002) **6**:887-902

DANKSAGUNG:

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bei Herrn Prof. Widdel möchte ich mich für die Möglichkeit in seiner Abteilung eine Doktorarbeit anzufertigen und für die Erstellung des Erstgutachtens bedanken.

Viel Dank gebührt Herrn Priv.-Doz. Dr. Ralf Rabus, der durch seine ausgezeichnete Betreuung und seine Anregungen viel zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Außerdem möchte ich mich bei allen Institutsmitarbeitern bedanken, die mir in den letzten drei Jahren geholfen haben: Ramona Appel für ihre Hilfe bei der HPLC Analytik, Lev Neretin für seine Hilfe bei der Real-Time RT-PCR-Analytik, Daniela Lange für ihre Einführung in die anaeroben Arbeitstechniken und die Durchführung einiger Experimente und Patrizia Wecker für die Durchführung bioinformatischer Analysen.

Gedankt sei auch meinen Bürokollegen und allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie für die nette Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft. Ein Danke geht noch an Lars Wöhlbrand fürs Korrekturlesen.

Der größte Dank gebührt Henning Maas für seine Geduld, sein Verständnis und das Aushalten einer Fernbeziehung. Besonders in den schwierigen Phasen dieser Doktorarbeit war er mir eine große Hilfe.